Fabio Eudes Leal

**Alterações de subpopulações de células T CD4⁺ em
indivíduos infectados pelo HTLV-1 com paraparesia
espástica tropical (HAM/TSP)**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias
Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Leal, Fabio Eudes

Alterações de subpopulações de células T CD4⁺ em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) / Fabio Eudes Leal. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 2.Paraparesia espástica tropical 3.Linfócitos T CD4-positivos 4.Interleucina-17

USP/FM/DBD-157/12

AGRADECIMENTOS

É preciso uma sólida formação pessoal e emocional para enfrentar os desafios do árduo caminho acadêmico. **Meus pais e Briareu** são os pilares desta estrutura emocional e dos princípios acumulados durante minha formação pessoal e serei sempre grato por me darem o apoio incondicional e o conforto necessário em todos os momentos.

Ao final da minha residência médica tive a sensação, por um breve momento, que me tornara um especialista. Quando pensava na lista de pessoas que contribuíram de modo inestimável para minha formação, alguns mestres muito especiais me vinham à mente. Muitos deles não me ensinaram algo relacionado à minha formação profissional, mas contribuíram para meu amadurecimento e evolução como indivíduo e influenciaram diretamente a minha capacidade como profissional da área da saúde.

Mas quando a longa caminhada da formação profissional parecia se aproximar de sua conclusão, uma nova perspectiva me foi apresentada e mudou meu entendimento da profissão médica. A oportunidade que meu mestre e orientador **Esper Georges Kallás** me proporcionou mudou o curso da minha história. Neste processo, aprendi não só a explorar as fronteiras do conhecimento, mas a trabalhar em grupo, gerenciar conflitos, assimilar frustrações, superar minhas limitações, valorizar o que é importante e não se preocupar com pequenos problemas. Seus exemplos como pessoa e profissional norteiam grande parte das minhas ações e não ficarão limitados à orientação deste trabalho. Obrigado pela oportunidade acadêmica e pelo convívio diário de tantos anos que se converteu em uma amizade mais do que especial e em gratidão eterna.

A oportunidade dada me permitiu conhecer pessoas que tiveram papéis fundamentais no desenvolvimento deste projeto e pelas quais tenho uma imensa gratidão. Gostaria de agradecer a todos do **LIM-60** e da **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo** que contribuíram de diversas maneiras com este e outros trabalhos desenvolvidos neste período. Especialmente a **Roseli Antonia Santo, Vânia Regina Miguel,**

Sérgio Alves, Issler Moraes, Zelinda Bartolomei e Maria Candida Dantas pelo apoio administrativo, **Fernanda Romano Bruno, Helena Tomiyama, Bianca Natali Santos, Susan Ribeiro, Maria Teresa Maidana Giret, Thais Rodrigues e Maria Inês Oliveira** pela disponibilidade e ajuda em todos os aspectos relacionados ao trabalho no laboratório e muitas vezes fora dele, ao **Prof. Dr. Aluísio Cotrim Segurado**, a **Juliana Yamashiro e Youko Nukui** pelo trabalho ambulatorial com os pacientes com HTLV-1 e a **Walter Kleine Neto** pela contribuição inestimável com os ensaios de biologia molecular.

Esta lista de pessoas extremamente especiais se completa com mestres que contribuíram diretamente com a elaboração e o conteúdo deste trabalho, além do apoio e orientação contínuos nestes anos de trabalho e formação acadêmica. Agradeço à minha banca de qualificação composta por **Prof. Dr. Carlos Brites, Profa. Dra. Daniela Santoro Rosa e Dra. Karina Inácio Carvalho** que dedicaram seu precioso tempo à revisão deste trabalho em várias etapas e fizeram sugestões muito relevantes para sua conclusão.

Agradeço ainda aos professores **Dr. Douglas F. Nixon** e ao **Dr. Lishomwa Ndhlovu** que desempenharam papel crucial na minha formação como pesquisador e contribuíram diretamente para a realização deste trabalho de todas as formas possíveis.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	IV
Lista de abreviaturas e símbolos	VII
Resumo.....	IX
Abstract.....	X
Introdução	1
História do HTLV-1 e de suas principais apresentações clínicas	1
Epidemiologia do HTLV	3
Modos de Transmissão.....	4
Aspectos virológicos	5
Ciclo viral.....	8
Patogenia e alterações clínicas relacionadas ao HTLV-1	10
Leucemia de células T do adulto (LTA)	11
Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP)	13
Ectonucleotidase CD39 e a Interleucina IL-17	19
Objetivos	22
Materiais e Métodos.....	23
Voluntários participantes do estudo	23
Coleta das amostras	24
Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP).....	24
Descongelamento de CMSP.....	24
Carga Proviral do HTLV-1	25
Citometria de Fluxo	26
Seleção de subpopulações de células T CD4 ⁺ para ensaios funcionais	28
Ensaio de Elispot	29
Mensuração de múltiplas citocinas	30
Análise Estatística.....	30
Resultados: Manuscrito publicado	31
Resultados	31
Dados demográficos	31
Expressão de CD39 nos subgrupos de células T CD4 ⁺ de indivíduos não infectados.....	32
Análise funcional de células T CD4 ⁺ CD39 ⁺	35

Perfil de produção de citocinas de subgrupos de células T CD4 ⁺	36
Influência do anticorpo monoclonal CD39 na função de células T CD4 ⁺ CD39 ⁺	39
Análise de células T CD4 ⁺ com perfil fenotípico de células reguladoras em indivíduos infectados pelo HTLV-1	40
Frequência aumentada de células T CD4 ⁺ CD39 ⁺ CD25 ⁻ em pacientes com HAM/TSP.	42
Associação entre células T CD4 ⁺ CD39 ⁺ CD25 ⁻ e carga proviral do HTLV-1	44
Produção de IL-17 está reduzida em pacientes HAM/TSP	45
Produção de IL-17 e IFN- γ em pacientes HAM/TSP	47
Discussão.....	50
Conclusões	58
Anexos	59
Anexo 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	59
Pesquisador responsável.....	62
Anexo 2 Ficha de Dados Clínico-laboratoriais	63
Referências.....	67

Lista de figuras

Figura 1: Áreas de maior soroprevalência de HTLV-1.....	4
Figura 2: Estrutura do HTLV-1.....	6
Figura 3: Estrutura do genoma do HTLV-1.....	8
Figura 4: Mecanismos de imunopatogênese propostos para HAM/TSP.....	16
Figura 5: Expressão diferencial de CD25, CD39 e FoxP3 em células T CD4 ⁺ de indivíduos não infectados.....	34
Figura 6: Análise funcional de células T CD4 ⁺ CD39 ⁺ de indivíduos não infectados.....	36
Figura 7: Mensuração da produção de citocinas no sobrenadante.....	38
Figura 8: Especificidade do anticorpo monoclonal purificado anti-CD39 e efeito sobre co-culturas.....	39
Figura 9: Co-expressão de CD25 e FoxP3 em células T CD4 ⁺ (Treg) de indivíduos não infectados (CN), portadores assintomáticos de HTLV-1 (PA) e pacientes com HAM/TSP.....	40
Figura 10: Estratégia de análise para avaliar co-expressão de CD25, CD39 e FoxP3 em células T CD4 ⁺ de indivíduos não infectados, portadores assintomáticos de HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP.....	42
Figura 11: Expressão diferencial de CD39 e CD25 em células T CD4 ⁺ de controles não infectados (CN), portadores assintomáticos de HTLV-1 (PA) e pacientes com HAM/TSP.....	43

Figura 12: Associação entre células T CD4+ CD39+CD25- e níveis de carga proviral em indivíduos portadores assintomáticos de HTLV-1 (PA) e pacientes HAM/TSP.....44

Figura 13: Associação entre células T CD4+ CD39+CD25+ e níveis de carga proviral em indivíduos portadores assintomáticos de HTLV-1 (PA) e pacientes HAM/TSP.....45

Figura 14: Secreção de IL-17 de CMSP medida por ELISPOT.....46

Figura 15: Razão entre número de células secretoras de IL-17 e células Treg (CD25+CD39+), identificadas na população de linfócitos T CD4+.....47

Figura 16: Detecção de IFN- γ e IL-17 em subpopulações de células T CD4+ de acordo com a expressão de CD25 e CD39 em indivíduos não infectados, portadores assintomáticos de HTLV-1 e pacientes HAM/TSP.....49

Lista de Tabelas

Tabela 1. Especificações dos anticorpos monoclonais utilizados para marcação de proteínas de superfície.....27

Tabela 2. Especificações dos anticorpos monoclonais utilizados para marcação de proteínas intracelulares.....28

Tabela 3. Características demográficas e carga proviral.....32

Lista de abreviaturas e símbolos

%	porcentagem
ADP	adenosina difosfato
AMP	adenosina monofosfato
APC	aloficocianina
APC-Cy7	aloficocianina com cianina7
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albumina sérica bovina
CAP	células apresentadoras de antígeno
CD	cluster of differentiation
CMSP	células mononucleares do sangue periférico
CN	indivíduos não infectados
CTL	Célula T CD8 ⁺ HTLV-1-específica
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
EAE	encefalite auto-imune experimental
ECD	ficoeritrina
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	ensaio imunoenzimático
EM	Esclerose Múltipla
FBS	soro fetal bovino
FITC	isotiocianato fluorosceína
GLUT-1	transportador de glucose 1
HAM/TSP	Mielopatia associada ao HTLV-1/ Paraparesia espástica tropical
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HLA	antígeno leucocitário humano
hnRNPA1	ribonucleoproteína heterogênea nuclear A1
HTLV	vírus linfotrópico de células T humano
IDO1	indoleamina 2,3-dioxigenase 1
IFN	interferon
IL	interleucina
IQR	interquartil
LCR	Líquor cefalorraquidiano
LTA	leucemia de células T do adulto
LTR	segmentos terminais longo repetitivos
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar

mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NF-κB	fator nuclear kappa b
ng	nanograma
nm	nanômetro
NS	não significativa
OMS	organização mundial da saúde
ORF	fase aberta de leitura
PA	pacientes assintomáticos
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato/salina
PBST	PBS + 0,1% tween 20
PBSTB	PBST + BSA 1%
PCR	reação em cadeia da polimerase
PE	ficoeritrina
PFA	paraformolaldeído
PMA	forbol 12-miristato 13-acetato
R10	meio RPMI com 10% de soro fetal bovino
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TGF	fator transformador de crescimento
Th17	células produtoras de IL-17
Tind	células T indutoras
TNF	fator de necrose tumoral
Treg	células T reguladoras
WB	western blot
µg	micrograma
µL	microlitro

Resumo

Leal FE. Alterações de subpopulações de células T CD4⁺ em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

O equilíbrio entre resposta imune e tolerância resulta da complexa interação entre células efetoras e reguladoras. Células capazes de amplificar a resposta imune foram descritas, mas um subgrupo de células T com esta capacidade ainda não foi identificado. Demonstramos que a ectoenzima CD39 ajuda a definir um subgrupo de células T CD4⁺ denominadas células T indutoras (Tind), capazes de amplificar proliferação e produção de citocinas por células T CD4⁺ efetoras, antagonizando a atividade supressora de células T reguladoras (Treg). Em doenças auto-imunes e infecções crônicas como a mielopatia associada à infecção pelo HTLV-1 (HAM/TSP), Tinds podem ter papel importante no processo inflamatório exacerbado visto nestas condições clínicas.

Demonstramos ainda que as frequências de Treg estão aumentadas em pacientes infectados pelo HTLV-1 independentemente da condição clínica, mas apenas pacientes HAM/TSP apresentam aumento da frequência de Tind. Além disso, a frequência de Tind está associada à carga proviral, considerado fator de risco para o desenvolvimento da HAM/TSP. O aumento da produção de IFN- γ e a reduzida produção de IL-17 em pacientes HAM/TSP sugerem que células Th17 não possuem papel importante no processo inflamatório relacionado à infecção pelo HTLV-1, diferentemente do que ocorre em condições auto-imunes com quadros clínicos semelhantes à HAM/TSP. Estes dados demonstram importantes alterações no balanço entre inflamação e supressão e sugerem um papel para Tind na patogênese da HAM/TSP.

Descritores: 1. Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 2. Paraparesia espástica tropical 3. Linfócitos T CD4-positivos 4. Interleucina-17

Abstract

Leal FE. CD4⁺ T cell subsets changes in HTLV-1-infected subjects with Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) [Thesis]. Sao Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo"

The balance between immunity and tolerance is a result from the interplay between effector and regulatory cells. An immunoregulatory cell that amplifies cellular immune responses upon activation is already known; however no T-cell subset with such function has been described. We report that the ectoenzyme CD39 helps to delineate a novel subpopulation called inducer T-cell (Tind) that significantly increases the proliferation and cytokine production of effector T cells, counterbalancing the suppressive activity of regulatory T cells (Treg). In autoimmune conditions and chronic viral infections, such as HTLV-1 associated myelopathy, Tinds may play an important role in the inflammatory milieu.

Here we show that Treg frequency is increased in HTLV-1-infected subjects regardless of their clinical status, but only HAM/TSP patients have increased frequency of Tind. Besides, Tind frequency is associated to HTLV-1 proviral load, a established risk factor for the development of HAM/TSP. Increased IFN- γ and reduced IL-17 production seen in HAM/TSP patients suggest that Th17 does not play an important role in the proinflammatory milieu related to HTLV-1 infection, unlike autoimmune disorders with clinical features similar to HAM/TSP. Altogether, our data demonstrate important changes in the inflammatory-regulatory balance and suggest a role for Tind in the pathogenesis of HAM/TSP.

Descriptors: 1. Human T-lymphotropic virus 1 2. Paraparesis, Tropical Spastic 3. CD4-Positive T-Lymphocytes 4. Interleukin-17

Introdução

História do HTLV-1 e de suas principais apresentações clínicas

No começo da década de 70, um grupo de pesquisadores japoneses identificou a existência de uma doença linfoproliferativa até então desconhecida. A alta incidência de uma neoplasia hematológica de células T em adultos, especialmente entre indivíduos da província de Kyushu, desencadeou esforços para a identificação de causas genéticas ou virais que predispuessem à nova doença denominada leucemia de células T do adulto (LTA)(1). Em 1980, nos Estados Unidos da América, foi identificado o primeiro retrovírus humano, o vírus linfotrópico de células T humano do tipo 1 (HTLV-1), a partir de culturas celulares de dois pacientes com diagnóstico de linfoma cutâneo de células T com características clínicas incomuns à época(2). A associação etiológica foi determinada inicialmente baseada nos seguintes fatos:

- Correspondência entre áreas de alta incidência de LTA e de portadores de HTLV-1 identificados por testes sorológicos;
- Todos os pacientes com LTA possuem anticorpos contra HTLV-1;
- Há integração monoclonal do DNA proviral do HTLV-1 em células T de pacientes diagnosticados com LTA;
- HTLV-1 é capaz de imortalizar células T humanas *in vitro*;

Simultaneamente, caracterizava-se na mesma província de Kyushu uma síndrome espástica paraparética predominantemente de trato piramidal e com curso clínico lentamente progressivo. Anticorpos contra HTLV-1 eram identificados no soro e no líquido cefalorraquidiano (LCR) destes pacientes, o que sugeriu que o vírus recém-descrito em pacientes com LTA poderia ser a causa deste quadro clínico neurológico(3). A descrição simultânea em pacientes do Caribe de títulos elevados de anticorpos contra o HTLV-1

associados a uma síndrome denominada paraparesia espástica tropical(4) culminou com a caracterização de uma mielopatia crônica progressiva que passou a ser conhecida como Mielopatia Associada ao HTLV-1 ou Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP)(5).

Dois anos após a descrição do HTLV-1, outro vírus com significativa similaridade genética foi descrito em um paciente com neoplasia hematológica e denominado HTLV-2(6). Apesar do relato de alterações neurológicas compatíveis com HAM/TSP em pacientes portadores de HTLV-2(7), a associação com quadros clínicos inflamatórios e hematológicos não é claramente estabelecida.

As técnicas laboratoriais desenvolvidas para a identificação dos dois primeiros retrovírus descritos foram fundamentais para a descoberta do vírus da imunodeficiência humana (HIV) em 1983, responsável por uma das maiores epidemias da humanidade(8, 9).

Após 30 anos de grande evolução do conhecimento em virologia e imunologia proporcionados pela pesquisa em retrovirologia, a patogênese das formas clínicas relacionadas à infecção pelo HTLV-1 ainda não foi completamente esclarecida. Além disso, nenhum tratamento clínico se mostrou capaz de alterar de forma significativa a história natural da HAM/TSP e a LTA continua sendo uma neoplasia hematológica de prognóstico ruim.

Apesar de algumas medidas de prevenção terem sido capazes de reduzir a transmissão sexual, vertical e por transfusão de sangue e seus derivados, ainda não existe vacina disponível para o HTLV e o vírus mantém sua cadeia de transmissão.

Este projeto se iniciou com a descrição, em pacientes saudáveis, de uma subpopulação de linfócitos com uma capacidade peculiar: induzir linfoproliferação de células T CD4⁺(10). Diante disso, formulamos a hipótese de que esta subpopulação pudesse ter relevante participação na patogênese da HAM/TSP pela conhecida ativação celular e linfoproliferação presentes em pacientes com esta síndrome.

Para contribuir com o maior entendimento da interação entre o HTLV-1 e o sistema imunológico, realizamos uma análise comparativa de aspectos específicos da imunidade celular de indivíduos não infectados (CN), portadores assintomáticos de HTLV-1 (PA) e pacientes com diagnóstico de HAM/TSP.

Epidemiologia do HTLV

Apesar de ser encontrado em vários continentes, existem áreas conhecidamente com maior soroprevalência do HTLV-1. Os inquéritos epidemiológicos no Caribe e América Central revelam uma prevalência de 3% a 6%(11). No sul do Japão, a soroprevalência atinge valores de até 30%. Outras áreas identificadas como bolsões de ocorrência de infecção pelo HTLV-1 são a Melanésia, costa oeste africana, Peru e nordeste brasileiro (Figura 1)(12). Estima-se que 10 a 20 milhões de pessoas vivam com HTLV no mundo, sendo 750 mil no Brasil (Ministério da Saúde – 2004).

A maioria dos estudos de prevalência foram realizados em doadores de sangue. De acordo com estes estudos, a área de maior prevalência de HTLV-1 no Brasil é a Bahia, com taxas de positividade nos testes sorológicos de 1,35% entre doadores de sangue(13). Em um estudo populacional em Salvador, o índice foi de 1,75% da população avaliada(14).

A infecção por HTLV-2 acomete diversas populações, que incluem desde índios Yanomami, com descrição de soroprevalência de 13,7%, a usuários de drogas injetáveis na Bahia que apresentam índices de prevalência de 35,2%(15).

Figura 1: Áreas de maior soroprevalência de HTLV-1. As áreas de maior prevalência de HTLV-1 no mundo estão representadas em amarelo (Adaptado do Guia de Manejo Clínico do Paciente com HTLV – Ministério da Saúde, 2004)

Modos de Transmissão

Os principais modos de transmissão do HTLV são:

1. Materno-fetal: através da contaminação intra-uterina, periparto ou principalmente pelo aleitamento materno(16)
2. Transfusão de hemoderivados contaminados(17)
3. Relações sexuais, com risco de transmissão significativamente maior do homem para mulher do que da mulher para o homem(18).

Medidas de prevenção como teste sorológico durante a gravidez em regiões de alta prevalência, triagem sorológica de doadores de hemoderivados obrigatória desde 1986 no Japão(19) e posteriormente em diversos países, inclusive no Brasil(20), e uso de preservativos nas relações sexuais têm contribuído para redução gradual da prevalência do HTLV-1.

Aspectos virológicos

O retrovírus HTLV pertence à subfamília *Retroviridae*, gênero *Deltaretrovirus*. Há quatro tipos identificados, incluindo HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4. A descrição do HTLV-3 e HTLV-4 ocorreu recentemente(21, 22) e não existem evidências até o momento que estes retrovírus estejam associados ao desenvolvimento de doenças em humanos(23). O foco desta seção será o HTLV-1 com comparações com o HTLV-2 quando pertinente.

A principal diferença em relação ao gênero *Lentivirus*, que inclui o HIV-1 e o HIV-2, é o efeito sobre as células T que cada gênero exerce. Apesar de também causarem infecção assintomática por longos períodos, os *Deltaretrovirus* são capazes de conduzir as células T à transformação e imortalização celular(24), enquanto os *Lentivirus* possuem efeito citopático que leva comumente à destruição da célula infectada(25).

O HTLV-1 é filogeneticamente classificado em três grupos, que reflete sua distribuição geográfica: Melanésio, Centro-Africano e Cosmopolita. O grupo cosmopolita é subdividido em quatro subgrupos: transcontinental (A), japonês (B), africano do oeste (C) e norte africano (D) baseado na sequência de suas LTRs(26). Os genótipos filogenéticos têm forte relação com o local de origem do indivíduo, o que dificulta o estudo de desfecho clínico relacionado ao subgrupo viral. Mesmo comparando pacientes de áreas diferentes, não é possível excluir fatores geográficos e populacionais que potencialmente influenciem a evolução clínica.

O HTLV apresenta-se como partículas esféricas de 100nm de diâmetro, revestidas por um envelope composto por elementos da membrana da célula hospedeira e glicoproteínas virais. A porção central, também esférica, contém duas cópias de RNA de fita simples, as enzimas virais e as proteínas da matriz.

Figura 2: Estrutura do HTLV-1. Cortesia do webiste da Ohio State University (<http://researchnews.osu.edu>).

O genoma proviral contém aproximadamente 9000 nucleotídeos com dois segmentos terminais longos repetitivos (*Long Terminal Repeat*, LTR) nas extremidades 5' e 3' do genoma. Os LTRs participam do processo de integração proviral, e contêm elementos reguladores da transcrição viral(27).

Resumidamente, os genomas virais do HTLV-1 e do HTLV-2 são divididos nas seguintes regiões:

- *gag* – codifica proteínas estruturais do capsídeo, nucleocapsídeo e matriz virais. São denominadas p15, p24 e p19
- *pol* – região de transcrição das enzimas protease, transcriptase reversa e integrase
- *env* – responsável pela codificação das glicoproteínas do envelope gp46 e gp21
- *pX* – contém quatro pequenas regiões abertas de leitura (*Open Reading Frames* – ORFs): *pX-I*, *pX-II*, *pX-III* e *pX-IV*
 - *pX-I* e *pX-II* – codificam as proteínas p12 e p30 respectivamente. São importantes no processo inicial de infecção e na persistência viral(28)

-
- *pX-III* – contém o gene *rex* que codifica a proteína p27 no HTLV-1 e p21 no HTLV-2. Atuam em nível pós-transcricional, estabilizando o mRNA viral. São fundamentais no processo de exportação do mRNA do núcleo para o citoplasma(29).
 - *pX-IV* – contém o gene *tax* que codifica a proteína p40 (Tax1) no HTLV-1 e p37 (Tax2) no HTLV-2. Responsáveis pela transativação do segmento LTR e de genes celulares relacionados à ativação e proliferação celulares. Atua também em proto-oncogenes como *c-fos* e *c-erg*.

As LTRs são sequências de nucleotídeos nas extremidades do genoma viral. São divididas em 3 partes:

- *U5*, *R* e *U3* – contém regiões que controlam a transcrição viral
- Elementos responsivos à proteína Rex – local de atuação de Rex para facilitar exportação do mRNA
- Elemento responsivo de 21 pares de bases – local de atuação de Tax para transativação transcricional

A transcrição inversa do genoma do HTLV-1 entre as regiões *env* e *pX* codifica uma proteína denominada HBZ que modula, assim como Tax, a transcrição de genes celulares e virais(30).

A similaridade entre os genomas provirais do HTLV-1 e do HTLV-2 é de 65%, sendo menor nos LTRs e maior na região dos genes reguladores(27).

Assim como os demais retrovírus, HTLV-1 e HTLV-2 possuem três regiões genômicas principais (*gag*, *pol* e *env*) que produzem poliproteínas posteriormente processadas pela enzima protease.

Os *Deltaretrovirus* possuem uma região em seu genoma denominada *pX*, responsável pela transcrição dos genes *tax* e *rex*. As proteínas Tax e Rex estão envolvidas na transativação do segmento LTR, de promotores heterólogos de transcrição celular e na regulação pós-transcricional da síntese de proteínas virais. Apesar de desempenharem funções

semelhantes às proteínas Tat e Rev do HIV-1, a similaridade da sequência de aminoácidos destas regiões é pequena quando comparados os genomas do HTLV-1 e do HIV-1.

Figura 3: Estrutura do genoma do HTLV-1. Nomes dos genes transcritos sobre cada linha. Linhas contínuas indicam exons e linhas pontilhadas indicam introns. Números representam a posição dos nucleotídeos relativa ao RNA viral. Baseado em ilustração de Kannian et al 2010(31)

Ciclo viral

O transportador de glucose 1 (GLUT1) foi a primeira molécula do complexo de receptores celulares de entrada do HTLV-1 a ser descrita(32). GLUT-1 é uma molécula amplamente presente na membrana de células humanas e com expressão variável de acordo com o tipo celular e os níveis de glucose plasmática. Outras moléculas envolvidas no processo de entrada viral na célula foram identificadas em seguida. Heparan sulfato proteoglicano (HSPG) e neuropilina-1 completam o complexo de receptores atualmente

aceito para explicar o modelo de entrada e o tropismo celular do HTLV-1 e do HTLV-2(33, 34). Apesar de ter sido encontrado em diversas células do organismo como monócitos, células B, macrófagos e células dendríticas(35, 36), a replicação e persistência do HTLV-1 são vistas principalmente em células T CD4⁺ e menos frequentemente em células T CD8⁺(37). Já o HTLV-2 infecta preferencialmente células T CD8⁺ ao invés de células T CD4⁺(38). O tropismo preferencial pode ser explicado pela maior dependência do HTLV-1 e do HTLV-2 de diferentes componentes do complexo de receptores. Enquanto o HTLV-1 requer maiores concentrações de HSPG para ligar-se a membrana celular, o HTLV-2 requer maiores níveis de GLUT-1(39). De fato, células T CD4⁺ expressam altos níveis de HSPG e baixos níveis de GLUT-1, enquanto células T CD8⁺ apresentam um padrão inverso de expressão destas mesmas moléculas.

A glicoproteína viral gp46 interage inicialmente com o complexo de receptores celulares permitindo que gp21, que contém um domínio transmembrana, participe do processo de fusão das membranas viral e celular(40). Após a fusão das membranas mediada pela gp21, o capsídeo viral é liberado. A transcriptase reversa transcreve o genoma viral de RNA para cDNA de dupla fita e o cDNA é transportado para o núcleo. No núcleo celular, a integrase insere o genoma viral no DNA da célula e os mRNAs virais começam a ser transcritos. Após a integração, o material genético viral está disponível tanto para replicação viral através da transcrição dos mRNAs como para amplificação proviral através da divisão celular estimulada pela proteínas virais Tax e HBZ.

Tax é uma proteína de 40 kDa que tem como função primária ativar a expressão de genes virais através da interação com fatores de transcrição em uma região da LTR denominada elementos responsivos a Tax (TRE)(41). Tax também é responsável pela ativação da transcrição de genes celulares ao modular pelo menos dois promotores de transcrição, o fator nuclear κ B (NF- κ B) e o elemento de resposta sérica (SRE). NF- κ B é um fator de transcrição responsável pela regulação da expressão de diversos genes envolvidos na resposta imune, proliferação celular, apoptose e

migração celular(42). Desta forma, Tax ativa a expressão de diversos genes celulares e suprime a expressão de diversos outros, levando a um aumento da expressão de genes de diversas citocinas como IL-1, IL-2, IL-6, IL-15, receptores de citocinas e quimiocinas como CD25, CCR4, CCR7 e CXCR4, produtos de oncogenes *c-fos*, *fra-1*, *c-jun*, *erg-1*, *erg-2* e moléculas reguladoras do ciclo celular como ciclina D2, CDK4 e CDK6(43). Além do aumento da atividade transcricional, Tax induz transformação celular ao interagir com genes supressores de tumores, especialmente p53 e proteína retinoblastoma (Rb) e interferir em mecanismos de apoptose(44). Em suma, a combinação de diversos mecanismos é necessária para que Tax induza ativação, proliferação e eventualmente transformação celular.

Ao contrário da expressão variável de Tax, a expressão de HBZ ocorre de modo uniforme nas células leucêmicas e inibe fatores de transcrição viral, inclusive Tax. Postula-se que HBZ possa contribuir para o desenvolvimento de células leucêmicas ao estimular proliferação celular e inibir a expressão de Tax, o principal antígeno viral reconhecido pelas células T CD8⁺ HTLV-1 específicas(45), dificultando o reconhecimento de células neoplásicas e favorecendo sua persistência.

Diferentemente do HIV, o HTLV-1 não se encontra abundantemente na forma de vírions no plasma e secreções corporais. Apesar de mecanismos de transmissão viral intercelular terem sido descritos com a formação de sinapses virológicas através da reorganização de moléculas de adesão e do citoesqueleto celular(46), postula-se que a persistência viral baseia-se principalmente na mitose celular induzida pela ação de Tax e HBZ. Neste processo, o genoma proviral se multiplicaria juntamente com as células infectadas, perpetuando a infecção.

Patogenia e alterações clínicas relacionadas ao HTLV-1

A grande maioria de indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanece assintomática por toda a vida. Entretanto, 2% a 3% dos portadores assintomáticos (PA) desenvolvem HAM/TSP(5) ou outras alterações com

características inflamatórias, como por exemplo uveíte(47) e polimiosite(48), após período de latência indefinido. Análise retrospectiva da prevalência de LTA na região sudoeste do Japão estimou o risco cumulativo de desenvolvimento da doença em 2% a 6% dos indivíduos soropositivos(49).

A patogênese de ambos os espectros clínicos não está totalmente elucidada. O risco de desenvolvimento de doença está relacionado a características imunológicas do indivíduo, à idade e à forma de transmissão(13, 50, 51). As alterações clínicas na LTA são decorrentes basicamente da transformação celular induzida pelo vírus. Por outro lado, o meio inflamatório induzido pela infecção viral decorrente da resposta imune e da ação das proteínas virais são responsáveis pelas alterações clínicas nos casos de HAM/TSP e outras síndromes inflamatórias menos comuns. Não se sabe exatamente o que leva portadores assintomáticos de HTLV-1 a desenvolverem LTA ou HAM/TSP, mas acredita-se que a transmissão vertical é fator de risco para o desenvolvimento de LTA ao invés de HAM/TSP.

Leucemia de células T do adulto (LTA)

A leucemia de células T do adulto caracteriza-se clinicamente por adenomegalia generalizada, hepatoesplenomegalia, hipercalcemia, lesões osteolíticas e manifestações cutâneas como nódulos, placas, pápulas difusas e eritrodermia(1). Linfócitos atípicos com núcleos multilobulados são característicos desta doença e podem ser vistos no sangue periférico.

O Grupo Japonês de Estudos em Linfoma classificou clinicamente a LTA em quatro tipos de acordo com as características clínicas e a morfologia celular(52):

- Aguda (57%) – Adenomegalia, hepatoesplenomegalia, lesões cutâneas, hipercalcemia e lesões osteolíticas compõem o quadro clínico. Atipia celular linfocitária é vista com frequência e em

percentagem elevada de casos. Possui prognóstico ruim, com sobrevida média de 6,2 meses.

- Crônica (19%) – Linfocitose absoluta com aumento do número de células semelhante ao visto em leucemias crônicas de células T. Aumento da enzima desidrogenase láctica. Pode haver linfonodomegalia, visceromegalias e envolvimento cutâneo. Não há hipercalemia. Tempo médio de sobrevida de 24 meses.
- Linfomatosa (19%) – linfonodomegalia sem linfocitose associada. Diagnosticada pela caracterização histológica do linfonodo. Sobrevida média de 10 meses.
- Indolente (5%) – Ausência de envolvimento visceral, linfonodomegalia ou linfocitose. Caracterizada pela presença de pelo menos 5% de células T atípicas no sangue periférico. Pode se assemelhar clinicamente a micose fungóide. Sobrevida de anos enquanto a doença permanecer nesta fase.

As células T atípicas são maduras e expressam as moléculas CD4 e CD25. A integração do DNA proviral do HTLV-1 é monoclonal, indicativo que todas as células neoplásicas se originam de uma mesma célula. Porém, o local de integração do DNA proviral é variável entre os pacientes, sugerindo que o local de integração não é fator determinante na leucemogênese(53).

A interação entre a proteína viral Tax e vários sítios de transcrição celulares sugere um papel importante no processo de leucemogênese. Tax se associa com o fator de transcrição NF- κ B estimulando o ciclo de crescimento celular e inibindo apoptose. Aumenta a expressão de genes anti-apoptóticos (*bcl-X*)(54) e da cascata da caspase(55), além de diminuir a expressão de genes indutores da apoptose(56).

Apesar dos diversos efeitos promotores de leucemogênese de Tax verificados *in vitro*, a atividade desta proteína isoladamente não é suficiente para justificar as alterações linfoproliferativas vistas nos pacientes com LTA.

Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP)

Essa doença desmielinizante crônica e progressiva acomete a medula espinhal e a substância branca no sistema nervoso central(5). O quadro de fraqueza muscular proximal de membros inferiores é frequentemente associado a espasticidade muscular, alterações esfinterianas, reflexos patelares exacerbados, sinal de Babinski e alterações sensoriais variáveis.

O quadro clínico inicia-se de modo sutil mais frequentemente entre a quarta e a quinta décadas de vida. Qualquer dos sintomas acima descritos pode se apresentar de forma isolada. No início do quadro, os homens se queixam frequentemente de disfunção erétil e as mulheres de alterações do esfíncter vesical. Em um período que varia de meses a anos, surgem outros sintomas que compõem a síndrome, como fraqueza muscular em membros inferiores e a espasticidade que resulta em alterações de marcha e alterações sensoriais.

No Brasil, a HAM/TSP representa o principal espectro clínico dos pacientes com sintomas decorrentes da infecção pelo HTLV-1. Porém, a síndrome HAM/TSP em pacientes com quadro neurológico não contempla todas as manifestações inflamatórias possivelmente associadas à infecção pelo HTLV-1 como uveíte, artrite inflamatória, polimiosite ou síndromes auto-imunes como a Síndrome de Sjögren(57). Esta diversidade de apresentações clínicas com um fator comum, o processo inflamatório, sugere que as alterações causadas pelo HTLV-1 não se restrinjam ao sistema nervoso central.

Diversos estudos avaliaram fatores protetores e predisponentes ao desenvolvimento de HAM/TSP. Maiores níveis de carga proviral do HTLV-1 têm sido descritos como fator de risco para o desenvolvimento de HAM/TSP(58, 59). Embora sugira-se que uma maior carga proviral de HTLV-1 esteja associada com a patogênese da HAM/TSP, até 10% dos pacientes

diagnosticados com este quadro neurodegenerativo apresentam carga proviral baixa(59), definida como até 1% de células mononucleares infectadas no sangue periférico. Além disso, a carga proviral de pacientes assintomáticos familiares de pacientes HAM/TSP é nove vezes mais alta que a carga proviral de pacientes assintomáticos em geral, o que sugere que fatores genéticos podem estar envolvidos na determinação da carga proviral sem necessariamente representar maior risco de desenvolvimento de doença neurológica(59). Devido ao longo e variável período de latência da infecção, ainda não há estudos que avaliaram sistematicamente a evolução de pacientes assintomáticos para HAM/TSP. É incerto se a elevada carga proviral do HTLV-1 em pacientes HAM/TSP é uma das causas ou apenas o resultado de um processo inflamatório e linfoproliferativo característico deste grupo de pacientes.

Aspectos genéticos do HTLV-1 foram avaliados como possíveis fatores predisponentes ao desenvolvimento de HAM/TSP. A sequência genética de *tax* em pacientes assintomáticos e com HAM/TSP foram comparadas(60). A substituição de quatro nucleotídeos foi considerada como associada a maior risco de desenvolvimento de HAM/TSP, mas não está claro como isto poderia estar relacionado à patogênese da HAM/TSP. Supostamente, esta variação genética poderia alterar a capacidade de transativação de genes celulares pela proteína Tax.

Estudos de imunogenética demonstram que pacientes HLA-A02 ou HLA-Cw08 têm menores níveis de carga proviral e, supostamente, risco reduzido de desenvolverem HAM/TSP(61, 62). Sugere-se que linfócitos T citotóxicos HLA-A02 restritos eliminem mais eficientemente células T CD4⁺ infectadas, determinando menor carga proviral.

A patogênese da doença está associada ao processo inflamatório no sistema nervoso central relacionado à resposta imune ao HTLV-1. Os mecanismos mais aceitos são resumidos na **Figura 2**:

- Células T CD4⁺ e células T CD8⁺ HTLV-1-específicas migram através da barreira hemato-encefálica, indo do sangue periférico ao sistema

nervoso central. Células T infectadas pelo HTLV-1 que expressam antígenos virais são reconhecidas pelas células T CD8⁺ HTLV-1-específicas, desencadeando uma resposta imune que resulta na produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e na ruptura das células infectadas. A produção das citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF- α , principalmente por células T CD4⁺ e T CD8⁺, associada a citólise decorrente da ação das células T CD8⁺ HTLV-1-específicas, podem danificar as células gliais e os neurônios. Este processo decorre tanto da ativação da micróglia e de astrócitos por efeito do IFN- γ como pela possível neurotoxicidade de glicoproteínas virais, semelhante ao processo neuroimunopatogênico verificado com a glicoproteína gp120 do HIV(63-65).

- Imunoglobulinas IgG contra a proteína viral Tax de pacientes HAM/TSP apresentam capacidade de reatividade cruzada com auto-antígenos de células do sistema nervoso central através do fenômeno de mimetismo molecular(66, 67). Ao interagirem com a proteína ribonucleica heterogênea A1 (hnRNP-A1), molécula que desempenha importante papel no transporte de mRNA do núcleo para o citoplasma de neurônios, anticorpos anti-Tax induzem dano neurológico por reação inflamatória neuronal e consequentemente desmielinização em pacientes com HAM/TSP.

Figura 4: Mecanismos de imunopatogênese propostos para HAM/TSP.
Ilustração adaptada de Nagai e Osame, 2003.

Este processo inflamatório está diretamente relacionado a expressão da proteína Tax, que possui diversos efeitos sobre as células infectadas. Entre suas principais capacidades, destacam-se a ativação do fator nuclear NF- κ B e subsequente estímulo de proliferação e ativação celulares(68) com aumento da produção de IL-2 e da expressão da fração alfa de seu receptor, denominada CD25. Outras citocinas pró-inflamatórias como IL-15, TNF- α e IFN- γ também têm sua produção estimulada pela ação de Tax e parecem contribuir para o ambiente pró-inflamatório identificado em amostras de sangue periférico e sistema nervoso central de pacientes HAM/TSP(69, 70).

O papel da imunidade celular na patogênese da HAM/TSP tem sido amplamente estudado mas o risco de desenvolvimento de alterações neurológicas continua indefinido. Tax é o antígeno imunodominante reconhecido pelas células T CD8⁺(71). A importância deste subgrupo celular no controle da replicação viral é evidenciada por duas funções: a capacidade de destruir via perforina células T CD4⁺ que expressam Tax e o aumento de expressão do antígeno viral em células T CD4⁺ na ausência de células T CD8⁺(72). Análises do papel de células T CD8⁺ específicas contra Tax no

controle da infecção demonstram correlação negativa entre atividade citolítica deste subgrupo celular e carga proviral, mas este fenômeno ocorre tanto em pacientes HAM/TSP como nos portadores assintomáticos do HTLV-1(73, 74). Além disso, há uma correlação positiva entre frequência de células T CD8⁺ HTLV-1-Tax-específicas e carga proviral, sugerindo que a resposta celular mediada por células T CD8⁺ não seja suficiente para controlar replicação viral e sequer eficaz para prevenir o desenvolvimento de HAM/TSP(75, 76). Aliás, acredita-se que a frequência significativamente aumentada de células T CD8⁺ HTLV-1-Tax-específicas no sangue periférico e no líquido cefalorraquidiano contribua para as alterações inflamatórias vistas em pacientes HAM/TSP através da liberação de citocinas neurotóxicas como TNF- α e IFN- γ (64, 77, 78). Ademais, nosso grupo demonstrou recentemente que células T CD8⁺ HTLV-1-Tax-específicas expressam níveis reduzidos da imunoglobulina de membrana de células T TIM-3(79). Aumento da expressão de TIM-3 em células T CD8⁺ é descrito em infecções crônicas virais como HIV, resultando em diminuída capacidade proliferativa e baixa capacidade de produção de citocinas do tipo Th1, fenômeno conhecido como exaustão celular(80). A reduzida expressão de TIM-3 em células T CD8⁺ HTLV-1-Tax-específicas sugere uma atividade inflamatória exacerbada através da produção de citocinas e proliferação celular. Além disso, análises histopatológicas evidenciam até 30% de células T citotóxicas HTLV-1-específicas nas lesões medulares de pacientes HAM/TSP(81). A indução por Tax da transativação de genes celulares relacionados à ativação de células T e linfoproliferação descritos anteriormente gera aumento do número de células T CD4⁺ infectadas, da expressão de Tax e maiores valores de carga proviral. O controle da carga proviral parece depender em parte do balanço entre proliferação de células infectadas e a capacidade dos linfócitos T citotóxicos de destruir estas células. Não está claro se este mecanismo de imunidade celular tem um efeito protetor ao diminuir a carga antigênica ou se pode ser deletério ao causar dano tecidual adjacente.

Células T reguladoras (Treg) são outro subgrupo celular relevante no estudo da resposta imune ao HTLV-1. Nas infecções crônicas, Tregs são importantes na supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias(82) e na inibição da ativação de células T CD4⁺ efetoras, células apresentadoras de antígeno (APC) e células T CD8⁺(83). O mecanismo de supressão é dependente de contato celular, mas fatores solúveis também participam do processo de interação entre células supressoras e células efetoras. Um dos grandes desafios desde a descoberta das células Treg é a identificação de marcadores capazes de definir esta subpopulação. CD25 foi o primeiro marcador utilizado na descrição de um subgrupo de células T CD4⁺ com capacidade de supressão da ativação e proliferação celulares(84). No entanto, a expressão de CD25 em células T CD4⁺ de memória e efetoras limita sua utilização como identificador de células com capacidade supressora, já que apenas uma pequena parcela das células T CD4⁺ que expressam CD25 são Tregs(85). Diversos outros marcadores como CTLA-4, OX40, GITR e ICOS foram identificados em Tregs, sem no entanto diferenciá-las fenotipicamente de modo preciso dos demais subgrupos celulares(86-89). A busca por um marcador específico para identificação de Treg levou à descrição do fator de transcrição FoxP3, gene fundamental para o desenvolvimento e função supressiva desse subgrupo celular(82). Porém, sua utilização em ensaios funcionais é limitada por se tratar de proteína nuclear, o que exige a permeabilização e fixação das células para sua marcação, inviabilizando a realização de ensaios posteriores com cultivo celular. Além disso, células T CD4⁺ FoxP3⁺ são funcional e fenotipicamente heterogêneas. Atualmente, a definição de células Treg se baseia na combinação de diversos marcadores que auxiliam na definição de um subgrupo de células entre o conjunto de células com capacidade supressiva que não necessariamente representa a totalidade de células Treg.

Diversos estudos em pacientes com HTLV-1 indicam redução na frequência de células reguladoras ao se utilizar como marcadores CD25, CD127 e FoxP3(90-92). Além disso, ensaios *in vitro* utilizando transfecção com plasmídeo codificando Tax, demonstram efeito supressor desta

proteína na expressão de FoxP3 e de TGF- β , críticos para o desenvolvimento de Treg(92, 93). Postula-se que essa perda de imunoregulação seria um dos mecanismos responsáveis pelo comprometimento da tolerância imunológica e contribuiria para o processo inflamatório visto em pacientes com HAM/TSP. Coincidentemente, verifica-se uma correlação inversa entre a frequência de células com perfil regulatório e a atividade citolítica de células T CD8 efectoras(94).

Por outro lado, há relatos de aumento da expressão de FoxP3 em pacientes com HAM/TSP quando comparados a controles saudáveis(94, 95). Esse aumento pode estar relacionado a uma tentativa de controlar a ativação celular desencadeada por Tax. De qualquer forma, estes dados ilustram a dificuldade e indefinição quanto ao real papel das células T reguladoras na patogênese do HAM/TSP.

Apesar da avaliação dos diversos fatores envolvidos no desenvolvimento da HAM/TSP, a patogênese desta condição ainda não foi completamente elucidada. Ainda não se sabe o porquê de apenas 2% a 3% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 desenvolverem HAM/TSP e um número incerto apresenta outros sintomas com características inflamatórias muitas vezes debilitantes.

Ectonucleotidase CD39 e a Interleucina IL-17

A molécula CD39, uma ectonucleotidase transmembrana que hidrolisa adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP) em adenosina monofosfato (AMP), é expressa em células NK ativadas, células B após ativação, células T e células endoteliais, com papel importante na tromboregulação e homeostase vascular(96). O ATP tem efeitos pró-inflamatórios e sua degradação pode mediar efeitos inibitórios ou estimulantes do sistema imunológico. O papel do CD39 nas células T CD4⁺ é descrito como um marcador de superfície de células T reguladoras em camundongos e humanos(97, 98). Tregs que expressam CD39 são capazes de suprimir a produção de IL-17, mas sua função supressiva é reduzida em

pacientes com Esclerose Múltipla (EM)(99), uma doença neurodegenerativa que também se caracteriza pela alta produção de IL-17(100) e muitas similaridades clínicas com o quadro de HAM/TSP.

Neste trabalho, inicialmente caracterizamos diferentes subpopulações de células T CD4⁺, com o emprego de marcadores para várias proteínas, incluindo CD25, CD39, FoxP3. Surpreendentemente, demonstramos que a expressão de CD39 na ausência de CD25 identifica um novo subgrupo de células T CD4⁺ com propriedades potentes de imunoestimulação(10). Sugerimos, com esses resultados, que células com este fenótipo consistem no que denominamos de linfócitos T CD4⁺ indutores (Tind).

Diante das características de ativação e proliferação celulares na infecção pelo HTLV-1, surgiu a idéia de avaliar a expressão de CD39 nas células T CD4⁺ de indivíduos infectados por este vírus, com a hipótese de que o equilíbrio entre Treg e Tind estaria alterado em virtude da natureza inflamatória da doença associada ao vírus. De fato, apresentamos resultados que apontam para um aumento de Tind em pacientes com HAM/TSP em comparação a portadores assintomáticos de HTLV-1 e indivíduos não infectados.

Vários trabalhos já conseguiram demonstrar maior perfil de ativação celular na infecção pelo HTLV-1 em portadores assintomáticos e na HAM/TSP, além de níveis elevados de carga proviral em indivíduos HAM/TSP(55, 59, 70, 90, 101-104). Decidimos, então, verificar se há uma correlação entre o aumento da frequência de Tind e valores de carga proviral em pacientes HAM/TSP. De fato, identificamos que há uma associação direta entre carga proviral e frequência de Tind em pacientes com HAM/TSP. Por fim, decidimos avaliar a produção de citocinas inflamatórias sabidamente envolvidas em quadros neuroinflamatórios como HAM/TSP e Esclerose Múltipla. Nossos resultados apontam para um aumento da produção de IFN- γ e diminuição de IL-17 em pacientes com HAM-TSP, verificada pela secreção da citocina por técnica de Elispot e por citometria de fluxo. Esses achados serão discutidos posteriormente.

Com este trabalho, pretendemos contribuir para o entendimento do processo imunopatológico da HAM/TSP e identificar novos métodos auxiliares de diagnóstico e alvos de tratamento ou prevenção do desenvolvimento da doença.

Objetivos

Objetivo geral 1: Caracterizar as subpopulações de linfócitos T CD4⁺, com foco nos marcadores ligados às células Treg em indivíduos saudáveis

Objetivo geral 2: Avaliar a frequência de células Treg e Tind em indivíduos infectados pelo HTLV-1, tanto assintomáticos como com diagnóstico de HAM/TSP.

Objetivo geral 3: Avaliar a produção de IL-17 e IFN- γ e a frequência de células Th17 em indivíduos infectados pelo HTLV-1, tanto assintomáticos como com diagnóstico de HAM/TSP.

Objetivos específicos:

1. Avaliar a expressão de CD39 em células T CD3⁺
2. Analisar o perfil de produção de citocinas de células T CD4⁺ CD39⁺
3. Explorar o papel do CD39 na função de células T CD4⁺ CD39⁺
4. Determinar a frequência das subpopulações de células T CD4⁺ em pacientes infectados pelo HTLV-1 de acordo com a expressão de CD25 e CD39
5. Determinar a carga proviral em pacientes infectados pelo HTLV-1 e avaliar possíveis associações com outros parâmetros imunológicos
6. Análise da produção de citocinas pelas células Treg, Tind e Th17

Materiais e Métodos

Voluntários participantes do estudo

Foram incluídos 37 pacientes do ambulatório de HTLV-1 da Universidade de São Paulo com diagnóstico confirmado de infecção por HTLV-1 por Western Blot e 19 indivíduos com sorologia de HTLV-1 negativa. Este estudo foi aprovado pelo Conselho de Revisão Institucional e Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo (CAPPesq), número do processo 0855/08. Todos os participantes leram, entenderam e tiraram suas dúvidas antes de assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 1**) e se submeter a qualquer avaliação clínica e laboratorial. Este documento obedece às recomendações da Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde e seus adendos.

Os voluntários foram convidados a participar de uma coorte longitudinal e foram avaliados em média a cada seis meses através de anamnese, exame físico e testes laboratoriais. Os pacientes com diagnóstico de HTLV-1, 24 assintomáticos e 13 portadores de HAM/TSP, foram submetidos à aplicação de um questionário específico sobre possíveis sintomas associados à HAM/TSP e à realização de testes sorológicos para hepatite B, hepatite C, HIV, sífilis, doença de Chagas e tuberculose (**Anexo 2**).

Dez doadores do banco de sangue de Stanford-CA (EUA) forneceram amostras para a realização dos ensaios funcionais que caracterizaram as subpopulações de células T CD4⁺ de acordo com a expressão de CD25 e CD39. O estudo foi aprovado pela comitê de ética em pesquisa da Universidade da Califórnia de São Francisco (UCSF) nos Estados Unidos.

Coleta das amostras

Após punção venosa periférica em antebraço, coletou-se 90 mL de sangue em tubos a vácuo com EDTA (anticoagulante).

O material coletado no ambulatório do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da FMUSP foi encaminhado ao Laboratório de Investigação Médica 60 (LIM60) da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP e processado em até 24 horas.

Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

Amostras de sangue foram processadas por centrifugação de gradiente com Ficoll-Paque PLUS (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) para separação de células mononucleares de sangue periférico (CMSP). As células isoladas foram avaliadas quanto a viabilidade pela coloração por azul de tripan 1% (Sigma) e criopreservadas em DMSO 10% no FBS na concentração celular estabelecida de 1×10^7 células/mL.

Descongelamento de CMSP

Amostras criopreservadas foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37°C. Em seguida, 1 mL de RPMI 1640 com 10% de FBS (meio de cultura – R10) a 37°C foi adicionado ao tubo. O volume total foi transferido para um tubo Falcon contendo 10 mL de R10 a 37°C e as amostras foram centrifugadas por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e as células foram diluídas em 5mL de R10 para realização da contagem celular em câmara de Neubauer. Após a contagem, as amostras foram novamente centrifugadas para o ajuste de concentração a 1×10^6 células/mL para realização dos experimentos de

Elispot e 5×10^6 células/mL para a realização dos experimentos de citometria de fluxo.

Carga Proviral do HTLV-1

HTLV-1 DNA proviral foi extraído de CMSP usando um kit comercial (Qiagen GmbH, Hilden Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi usado como um modelo para amplificar um fragmento de 158 pb da região *tax* do genoma viral utilizando primers previamente publicados(90). O ensaio de PCR SYBR em tempo real foi realizado em 25µl contendo mistura para PCR de 10x Tris (pH 8,3; Invitrogen, Brasil), 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM de cada primer, 0,2 mM de cada dNTPs, SYBR Green (18,75 Unidades / $r \times n$; Cambrex Bio Science, Rockland, ME) e 1 unidade de Taq polimerase platinum (Invitrogen, Brasil). A amplificação foi realizada no sistema de Bio-Rad iQ iCycler usando uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 50 ciclos de 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Os primers do gene β globina GH20 e PC0435 foram usados como um calibrador de controle interno. Para cada corrida, as curvas padrão para o valor de HTLV-1 *tax* foram geradas a partir de células MT-2 diluídas em escala logarítmica $\log_{10}$ (10^5 - 10^0 cópias). O ciclo limite para cada amostra clínica foi calculado através da definição do ponto em que a fluorescência ultrapassava um determinado limite. Cada amostra foi analisada em duplicata e a média dos dois valores foi considerada como o número de cópias da amostra. A quantidade de provírus de HTLV-1 foi calculado da seguinte forma: número de cópias de HTLV-1 (*tax*) por 1.000 células = (número de cópias de HTLV-1 de *tax*) / (número de cópias da globina β / 2) $\times$ 1000 células. O método poderia detectar uma cópia por 10^3 CMSP.

Citometria de Fluxo

Após o procedimento de descongelamento e ajuste de concentração celular em meio de cultura, CMSP foram transferidas para placas de 96 poços com fundo em V (NUNC Brand Products) e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 200 μ L de tampão FACS (PBS com 0,5% albumina sérica bovina, 2 mM EDTA). A detecção fenotípica de superfície foi realizada em 10⁶ células após incubação com uma combinação dos anticorpos CD3, CD4, CD8, CD25, CD45RA, CD73, CD27, CD57, HLA-DR, CCR5, CD7, Ki-67, CD69 (BD Biosciences, San Diego, CA), CD39 (eBioscience, San Diego, CA), CD127 (Biolegend, San Diego, CA), todos conjugados a fluorocromos, e marcador de viabilidade *Live/Dead* (Invitrogen, Carlsbad, CA) por 30 minutos a 4°C.

Para a realização do painel que inclui marcação intracelular para FoxP3, foi utilizado CD39 conjugado a FITC. Para a avaliação do fenótipo apenas com marcadores de superfície, utilizou-se CD39 conjugado a PE. Os anticorpos monoclonais utilizados para marcação de superfície estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Especificações dos anticorpos monoclonais utilizados para marcação de proteínas de superfície

Anticorpo monoclonal	Fluorocromo	Fabricante
CD3	ECD	BD
CD4	APC-Cy7	BD
CD7	Alexa 700	BD
CD8	Pacific Blue	BD
CD25	APC	BD
CD27	APC	BD
CD57	FITC	BD
CD39	PE	eBioscience
CD39	FITC	eBioscience
CD45RA	FITC	BD
CCR5	FITC	BD
Ki-67	Alexa Fluor 488	BD
HLA-DR	PerCP	BD
CD69	PE-Cy7	BD
CD73	PE-Cy7	BD
CD127	FITC	Biolegend
LIVE/DEAD	Acqua (AmCyan)	Invitrogen

Para a marcação intracelular, as células foram fixadas e permeabilizadas com solução recomendada pelo fabricante (Human FoxP3 Buffer Set) antes da marcação com anticorpos monoclonais contra FoxP3 (BD Biosciences, San Diego, CA).

Com o objetivo de caracterizar a produção de citocinas pelas células T CD4⁺ do sangue periférico, foram utilizados anticorpos monoclonais conjugados contra IFN- γ (BD Biosciences, San Diego, CA) e IL-17

(Biolegend, San Diego, CA) após a marcação de superfície e incubação por 6 horas a 37°C em 5% CO₂ com estímulo de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e ionomicina em concentrações de 500 ng/ml e 50ng/ml respectivamente.

Tabela 2. Especificações dos anticorpos monoclonais utilizados para marcação de proteínas intracelulares

Anticorpo monoclonal	Fluorocromo	Fabricante
FoxP3	PE	BD
IFN- γ	PE-Cy7	BD
IL-17	FITC	Biolegend

Ao final de cada procedimento, as amostras foram fixadas com solução de PFA a 1% (Sigma) e submetidas a leitura no citômetro FACSCanto ou LSRFortessa (BD) utilizando o programa DIVA. Para cada amostra, pelo menos duzentos mil eventos foram adquiridos. Todos os dados foram analisados utilizando-se o software FlowJo (Tree Star, Inc.) versão 6.4 ou 9.2.

Seleção de subpopulações de células T CD4⁺ para ensaios funcionais

Amostras de CMSP de pacientes não infectados foram descongeladas como descrito acima e marcadas com anticorpos CD3, CD4, CD25 e CD39. Subpopulações de células T CD4⁺ foram selecionadas de acordo com a combinação dos marcadores CD25 e CD39 com pureza acima de 95% utilizando-se o equipamento FACS Aria (BD) para realização de *sorting*. Células T CD4⁺ que não expressam CD25 e CD39 foram definidas como células alvo e denominadas de células T respondedoras (Tres).

Células Tres foram marcadas com 1 mM de éster succinimidil carboxifluoresceína por 10 minutos a 37°C. As células T CD4⁺ CD25⁺ e CD39⁺ foram denominadas Tsup1 (CD39⁺CD25⁺) e Tsup2 (CD39⁻CD25⁺) pela sua capacidade supressora e Tind (CD39⁺CD25⁻) pela sua capacidade de induzir proliferação. As células Tres foram lavadas e ressuspensas em meio de cultura R-10 para co-cultura com as diferentes subpopulações de células T efectoras. As culturas e co-culturas celulares foram estimuladas por 96 horas com anticorpos CD3 e CD28 na concentração de 2,5µL/mL cada ou incubadas sem estímulo para controle do experimento. Os co-cultivos foram realizados com amostras de seis indivíduos saudáveis, em duplicata e com diferentes proporções de cada subpopulação. Análise da proliferação foi feita por citometria de fluxo através da verificação da redução de fluorescência no canal FITC das células Tres marcadas com CFSE.

Em experimentos para avaliar a influência da expressão da proteína CD39 na função de células T CD4⁺, realizamos co-culturas em proporções equivalentes de Tres com cada grupo de células T efectoras e adicionamos anticorpo monoclonal purificado anti-CD39 10µL/mL (Ancell) ou um controle isotípico murino purificado anti-IgG humana na mesma concentração (eBioscience)

Ensaio de Elispot

Placas ELISPOT MAIPS4510 (Millipore, Danvers, MA) foram revestidas com anti-IL-17 (10µg/ml) (Mabtech, Nacka Strand, Suécia) em PBS, 50 µl/poço por uma hora a temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, CMSP (1x10⁵/poço) e estímulo com PMA e ionomicina em concentrações finais de 500 ng/ml e 50 ng/ml respectivamente foram adicionados, com um volume final de 200 µL/poço. As placas foram incubadas a 37°C em 5% CO₂ durante 6 horas. Após a lavagem com tampão fosfato (PBS) mais 0,1% de Tween 20 (PBST), anticorpos anti-IL-17 biotinilado (1µg/ml) (Mabtech) foram adicionados aos poços apropriados em

PBS mais 0,1% tween e BSA 1% (PBSTB) por 30 minutos em temperatura ambiente. Placas foram lavadas novamente três vezes com PBST, seguido da adição de 50µl de estreptavidina conjugada a fosfatase alcalina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), na diluição de 1:1.000 em PBSTB, e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBST, incubadas com substrato azul (Vector Labs, Burlingame, CA) até que os pontos ficassem claramente visíveis e, em seguida, lavados com água corrente. Quando as placas foram secas, os pontos foram contados utilizando leitor de ELISPOT automatizado (AID – Autoimmun Diagnostika GmbH, Alemanha).

Mensuração de múltiplas citocinas

Sobrenadantes de culturas e co-culturas realizadas conforme descrito no item *seleção de subpopulações de células T CD4+ para realização de ensaio funcional* foram analisados em duplicata usando um ensaio de detecção simultânea de múltiplas citocinas (Biosource human cytokine 10-plex Panel kit – Invitrogen). Mensuramos os seguintes biomarcadores: TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10. A análise foi realizada de acordo com as orientações do fabricante com o sistema Luminex 100 (Luminex, Austin, TX).

Análise Estatística

Análise estatística foi realizada utilizando software Prism GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA). Testes estatísticos não-paramétricos foram utilizados. O teste Mann-Whitney U foi usado para fins de comparação e corrigido pelo método para múltiplas comparações de Bonferroni. O teste de Spearman foi utilizado para análises de correlação.

Resultados: Manuscrito publicado

Ndhlovu LC, **Leal FE**, Eccles-James IG, Jha AR, Lanteri M, Norris PJ, Barbour JD, Wachter DJ, Andersson J, Taskén K, Torheim EA, Aandahl EM, Kallas EG, Nixon DF. A Novel Human CD4+ T cell Inducer Subset with Potent Immunostimulatory Properties. *European Journal of Immunology*. **40**(1):134-41, 2010

Resultados

Dados demográficos

Todos os voluntários participantes deste estudo foram submetidos a triagem sorológica por método imunoenzimático (ELISA) para HIV-1/2, Hepatite B, Hepatite C e HTLV 1/2. Devido às frequentes reações falso-positivas e a incapacidade de diferenciar infecções por HTLV-1 e HTLV-2 por este método, o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 foi confirmado por Western Blot ou por reação em cadeia da polimerase (PCR), metodologias com especificidade significativamente maior(105). Indivíduos co-infectados por HIV-1/2, Hepatite B, Hepatite C e HTLV-2 foram excluídos do estudo. A condição clínica de cada paciente foi definida com base em critérios diagnósticos da OMS para doenças associadas ao HTLV-1(106).

A maioria dos pacientes infectados pelo HTLV-1 era do sexo feminino (67%), 17 no grupo assintomático e 8 pacientes com HAM/TSP, com mediana de idade de 47 (IQR 25%-75% 36-55) e 54 (IQR 25%-75% 36-61) anos, respectivamente. Foram incluídos 19 voluntários saudáveis pareados por idade e sexo, com as mesmas características demográficas dos participantes da coorte e sem evidência laboratorial de infecção por HTLV-1/2, Hepatite B, Hepatite C e HIV-1/2 (Tabela 3)

Tabela 3. Características demográficas e carga proviral

Condição clínica	Não infectado n=19	Portadores Assintomáticos n=24	HAM/TSP [‡] n=13	p
Idade, em mediana de anos (Interquartil 25% - 75%)	39 (29-52)	47 (36-55)	54 (36-61)	NS
Gênero (Masculino/Feminino)	6/13	7/17	5/8	
Contagem de células CD4 ⁺ , em células/μL (média ± DP [†])	1217±419,4	1152±432,3	1305±606,6	NS
Frequência de células CD4 ⁺ (média ± DP)	48,75±7,16	54,6±10,92	54,54±7,80	NS
Carga proviral HTLV-1*, em cópias/10 ³ células (média ± DP)	N/A	68,91±124,61	249,38±302,42	0,0026

*HTLV-1, Vírus linfotrópico de células T humano tipo 1; [‡]HAM/TSP, Mielopatia Associada ao HTLV-1 / Paraparesia Espástica Tropical. [†]DP, desvio padrão

Expressão de CD39 nos subgrupos de células T CD4⁺ de indivíduos não infectados

A expressão de CD39, CD25 e FoxP3 em células T CD4 foi determinada inicialmente em amostras de sangue periférico de 10 indivíduos não infectados. Foram identificados dois subgrupos de células T CD4⁺: células CD39⁺FoxP3⁺CD25⁺ e CD39⁺FoxP3⁻CD25⁻ (Figura 5A e B). Células T CD4⁺ CD25⁺FoxP3⁺ são consideradas representativas de células Treg. Observamos que este subgrupo está representado principalmente na fração CD39⁺CD25⁺, apesar de notarmos sua presença também entre células T CD39⁻CD25⁺ (Figura 5C).

A frequência de células T CD4⁺ tanto CD39⁺FoxP3⁺ como CD39⁺FoxP3⁻ variou entre 1 e 5% do total de células T CD4⁺ em indivíduos não infectados. As frequências de células T CD4⁺ CD39⁺CD25⁺ e

CD39⁺CD25⁻ variaram consideravelmente de indivíduo para indivíduo (Figura 5D), mas se mantiveram estáveis quando avaliadas longitudinalmente (Figura 5E). Após estímulo com anti-CD3 e anti-CD28 por 12 horas de cultura de células T CD4⁺ CD39⁻CD25⁻ (Tres), avaliamos a expressão de CD25 e CD39 e verificamos a presença destas moléculas na superfície celular, indicando um aumento da expressão induzido pelo estímulo utilizado (Figura 5F). CD73, CD57, CD27, HLA-DR, CD45RA, CCR5, CD7, Ki-67 e CD69 foram utilizados na tentativa de caracterizar melhor os subgrupos de células T CD4⁺ definidos pela expressão de CD25 e CD39. Entretanto, não houve expressão diferencial destes marcadores em nenhuma subpopulação (dados não mostrados).

Figura 5: Expressão diferencial de CD25, CD39 e FoxP3 em células T CD4⁺ de indivíduos não infectados. (A) Definição de células T CD4⁺ que expressam FoxP3, CD25 e CD39, consideradas de perfil fenotípico compatível com função reguladora. (B) Dois grupos distintos de células T CD4⁺ CD39⁺ definidas e analisadas de acordo com a expressão de CD25 e CD39: CD39⁺FoxP3⁺CD25⁺ em verde e CD39⁺FoxP3⁺CD25⁻ em azul. (C) Células T CD4⁺ FoxP3⁺CD25⁺ foram caracterizadas de acordo com expressão de CD25 e CD39. (D) Frequência de células T CD4⁺ representativa de quatro indivíduos saudáveis. (E) Frequência estável de células T CD4⁺ CD39⁺CD25⁻ e CD39⁺CD25⁺ em amostras coletadas com 4 a 6 meses de intervalo de quatro indivíduos saudáveis. (F) Expressão de CD39 e CD25 em células T CD4⁺CD39⁻CD25⁻ previamente selecionadas por *sorting* após estímulo com anti-CD3 e anti-CD28 por 12 horas.

Análise funcional de células T CD4⁺ CD39⁺

Para analisar a capacidade funcional das distintas subpopulações de células T CD4⁺, realizamos inicialmente a separação destas subpopulações a partir de CMSP de indivíduos saudáveis através da utilização de *sorting* com pureza verificada > 95% em cada subgrupo. Avaliamos a capacidade de cada subpopulação de influenciar a capacidade proliferativa e de secreção de citocinas de células T denominadas “alvo”, Tres (CD4⁺CD39⁻CD25⁻) marcadas com CFSE. Em experimentos de co-cultura com estímulo por anti-CD3 e anti-CD28, observamos que células T CD4⁺CD39⁺CD25⁺, denominadas Tsup1, suprimiram significativamente a capacidade proliferativa de células Tres quando comparados com culturas apenas de Tres sob estímulos idênticos (Figura 6A e B). Entretanto, quando analisamos co-culturas de células T CD4⁺CD39⁺CD25⁻, denominadas Tind, com Tres, verificamos um aumento estatisticamente significativo da proliferação de Tres quando comparadas ao mesmo controle contendo apenas Tres estimuladas (Figura 6B e C). As influências tanto positiva como negativa sobre a capacidade proliferativa de Tres foram dose-dependente (Figura 6D). O acréscimo de células Tind restituiram parcialmente a capacidade proliferativa de células Tres previamente co-cultivadas com Tsup1 (Figura 6E).

Em seguida, analisamos a possibilidade de a indução de proliferação causada por Tind ser relacionada a fatores solúveis. Separamos sobrenadante após quatro dias de culturas contendo células de cada subgrupo celular isoladamente. Adicionamos quantidades idênticas em poços contendo apenas Tres marcadas com CFSE para avaliação de proliferação. Após estímulo com CD3 e CD28, sobrenadante de Tind estimuladas foram capazes de induzir proliferação significativa de Tres quando comparado ao sobrenadante obtido de Tres ou Tsup1 (Figura 6F).

Figura 6: Análise funcional de células T $CD4^+$ $CD39^+$ de indivíduos não infectados. (A,B) Figura representativa de co-cultura em duplicata de 50,000 células Tres marcadas com CFSE e igual número de células Tind ou Tsup1 ou Tres não marcadas com CFSE por 4 dias com estímulo de anti-CD3/anti-CD28. Proliferação celular de Tres visualizada pela diminuição da fluorescência do CFSE. (C) Experimento realizado com amostras de 6 indivíduos saudáveis. Análise estatística através do teste U de Mann Whitney com significância estatística se $p < 0.05$. (D,E) Co-cultura de Tres com diferentes razões de Tind e Tsup1 ou a combinação dos dois subgrupos celulares. (F) Co-cultura de Tres com sobrenadante derivado de cultura por 4 dias de cada subgrupo celular estimulado com anti-CD3/anti-CD28.

Perfil de produção de citocinas de subgrupos de células T $CD4^+$

Avaliamos a influência dos subgrupos de células T $CD4^+$ na produção de citocinas com um kit multiplex para análise de 10 citocinas no sobrenadante de co-culturas. Observamos um aumento evidente da produção de $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, GM-CSF, IL-6 e IL-10 em co-culturas de Tres com Tind quando comparadas com todas as demais subpopulações em co-cultura com Tres (Figura 7A). Por outro lado, estas citocinas eram

produzidas em níveis inferiores em co-culturas de Tres com células T CD4⁺ com fenótipo CD39⁺CD25⁺ (Tsup1) ou CD39⁻CD25⁺ (denominadas Tsup2 baseado no seu efeito supressor parcial descrito(99)), quando comparadas a cultura apenas de Tres (Figura 7A). Para determinar a atividade *ex vivo* de cada subgrupo celular, avaliamos o perfil de citocinas produzidas em culturas de cada subgrupo após estímulo com anti-CD3 e anti-CD28. Verificamos que Tind e Tsup1 produzem quantidades variáveis de citocinas quando comparadas a Tres sem ser possível definir um padrão específico para nenhum subgrupo celular (Figura 7B).

Figura 7: Mensuração da produção de citocinas no sobrenadante de: (A) co-culturas de T_{Res} e 1 = $CD39^+CD25^+$ (T_{Sup1}); 2 = $CD39^-CD25^+$ (T_{Sup2}); 3 = $CD39^+CD25^-$ (T_{Ind}); 4 = $CD39^-CD25^-$ (T_{Res}) com anti-CD3/anti-CD28, ou 5 = $CD39^-CD25^-$ (T_{Res}) sem estímulo. Dados apresentados são de um mesmo indivíduo e representam 3 experimentos com amostras de doadores distintos. (B) Subgrupos celulares individuais de 3 doadores distintos e a produção de citocinas representada com a média de experimento realizado em duplicata

Influência do anticorpo monoclonal CD39 na função de células T $CD4^+CD39^+$

A enzima CD39 tem conhecida ação sobre moléculas de ATP, degradando-as por hidrólise em ADP e AMP. Células Treg parecem inibir os efeitos inflamatórios de ATP através da ação de CD39(97). Com o objetivo de testar se a atividade biológica de CD39 está preservada em Tind e Tsup1, realizamos co-culturas de todos os subgrupos efetores com células Tres em quantidades idênticas na presença de anticorpo monoclonal anti-CD39 ou um controle isotípico e avaliamos a capacidade proliferativa de Tres através da diminuição da intensidade da fluorescência de CFSE. Observamos redução na capacidade proliferativa nas culturas com anti-CD39, com resposta residual presente apenas nas co-culturas com Tind (Figura 8A e B).

Figura 8: Especificidade do anticorpo monoclonal purificado anti-CD39 e efeito sobre co-culturas. (A) CMSP de doadores saudáveis foram incubados com anticorpo monoclonal purificado anti-CD39 (linha azul) ou controle isotípico (linha vermelha) antes de marcação de superfície com anti-CD39 conjugado. (B) Co-culturas em duplicata de Tres marcadas com CFSE e $CD39^+CD25^+$ (Tsup1), $CD39^-CD25^+$ (Tsup2) ou $CD39^+CD25^-$ (Tind) estimuladas com anti-CD3/anti-CD28 e incubadas com anti-CD39 purificado ou controle isotípico IgG. Células foram incubadas por quatro dias antes da avaliação de fluorescência de CFSE para quantificar proliferação de Tres.

Análise de células T CD4⁺ com perfil fenotípico de células reguladoras em indivíduos infectados pelo HTLV-1

A avaliação da co-expressão de CD25 e FoxP3 em células T CD4⁺ é a estratégia mais amplamente utilizada para identificar células Treg. A ausência ou reduzida expressão de CD127 é um marcador auxiliar na identificação desta subpopulação. Determinamos inicialmente a expressão de CD25 e FoxP3 em células T CD4⁺ com reduzida expressão de CD127 de amostras de 7 indivíduos não infectados, 17 portadores assintomáticos de HTLV-1 e 9 pacientes com HAM/TSP. Observamos aumento significativo da frequência de células T CD4⁺ que expressam CD25⁺FoxP3⁺ em portadores assintomáticos do HTLV-1 e em pacientes HAM/TSP quando comparados a indivíduos não infectados (Figura 9).

Figura 9: Co-expressão de CD25 e FoxP3 em células T CD4⁺ (Treg) de indivíduos não infectados (CN), portadores assintomáticos de HTLV-1 (PA) e pacientes com HAM/TSP. Barras representam mediana dos valores de cada grupo analisado. Análise estatística realizada através do teste de Mann-Whitney. Diferenças consideradas estatisticamente significantes se $p < 0.05$.

Em camundongos, a enzima CD39 é expressa em combinação com a proteína CD73 nesta subpopulação de linfócitos. Diversos biomarcadores de superfície além de CD39 foram testados para ajudar a delinear a população

Treg em seres humanos, incluindo CD73, mas não foram úteis para distinguir a população de Tregs de outros subgrupos de células T CD4⁺(10). A expressão de CD39 em linfócitos é restrita às células T CD4⁺ e tem sido largamente utilizada para identificar células Treg em combinação com CD25 e FoxP3(97, 98, 107). Baseados nesses marcadores, células T CD4⁺ que expressam FoxP3⁺CD25⁺ foram identificadas em indivíduos não infectados, portadores assintomáticos e pacientes HAM/TSP (Figura 10A). Assim como observamos em indivíduos não infectados (Figura 5C), células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ de indivíduos portadores assintomáticos de HTLV-1 e HAM/TSP são identificadas na fração CD39⁺CD25⁺, apesar de também estarem presentes entre células T CD4⁺CD39⁻CD25⁺ (Figura 10B). A expressão de CD39 na ausência de CD25 nas células T CD4⁺ identifica uma população com um perfil efetor e propriedades imunoestimulatórias denominada células T indutoras (Tind)(10, 107). A expressão de FoxP3 não está presente nessa subpopulação. A ausência de expressão de FoxP3 é compatível com o perfil efetor deste subgrupo.

Figura 10: Estratégia de análise para avaliar co-expressão de CD25, CD39 e FoxP3 em células T CD4⁺ de indivíduos não infectados, portadores assintomáticos de HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP. (A) Definição de células T CD4 que expressam FoxP3 e CD25⁺, consideradas de perfil fenotípico compatível com função reguladora. (B) Células Tind, mostradas no *gate*, não expressam FoxP3, diferentemente das células T CD4⁺CD39⁺CD25⁺ e células T CD4⁺CD39⁻CD25⁺. A expressão de FoxP3 nestas subpopulações está demonstrada pelos pontos azuis na sobreposição dos painéis A e B.

Frequência aumentada de células T CD4⁺CD39⁺CD25⁻ em pacientes com HAM/TSP.

Após a avaliação da frequência de células T com perfil fenotípico regulador de acordo com a expressão de FoxP3, CD25 e CD127, expandimos a análise fenotípica e examinamos o padrão de expressão de CD39 e CD25 em células T CD4⁺ de 19 indivíduos não infectados (CN), 24 portadores assintomáticos de HTLV-1 (PA) e 13 pacientes HAM/TSP. Frequências significativamente mais elevadas de células T

CD4⁺CD39⁺CD25⁺ foram encontradas em pacientes PA e HAM/TSP em comparação com CN, mas as frequências entre os dois grupos de pacientes infectados pelo HTLV-1 foram equivalentes (Figura 11A). Entretanto, a frequência de células T CD4⁺ CD39⁺CD25⁻ foi significativamente maior nos pacientes HAM/TSP em relação aos pacientes PA e indivíduos não infectados, sem que fosse verificada diferença significativa entre PA e CN (Figura 11B).

Figura 11: Expressão diferencial de CD39 e CD25 em células T CD4⁺ de controles não infectados (CN), portadores assintomáticos de HTLV-1 (PA) e pacientes com HAM/TSP. (A) Frequência de células T CD4⁺CD39⁺CD25⁺ em indivíduos não infectados, portadores assintomáticos de HTLV-1 e pacientes HAM/TSP. (B) Frequência de células T CD4⁺CD39⁺CD25⁻ em indivíduos não infectados, portadores assintomáticos de HTLV-1 e pacientes HAM/TSP. (C) Frequência de células T CD4⁺CD39⁻CD25⁺ em indivíduos não infectados, portadores assintomáticos de HTLV-1 e pacientes HAM/TSP. As barras representam a mediana dos valores. Análise estatística realizada através do teste de Mann-Whitney. Diferenças consideradas estatisticamente significantes se $p < 0.05$.

Associação entre células T CD4⁺ CD39⁺CD25⁻ e carga proviral do HTLV-1

Diante da comprovada associação entre carga proviral e desenvolvimento de HAM/TSP(59), decidimos avaliar se há correlação entre valores de carga proviral e subpopulações de células T CD4⁺ de acordo com a expressão de CD25 e CD39 em 24 indivíduos portadores assintomáticos de HTLV-1 e 13 pacientes HAM/TSP. Observamos uma correlação positiva, estatisticamente significativa, entre os níveis de carga proviral e a frequência e número absoluto de células T CD4⁺CD39⁺CD25⁻ (Tind) somente nos pacientes com diagnóstico de HAM/TSP (Figura 12).

Figura 12: Associação entre frequência (A) e número (B) de células T CD4⁺CD39⁺CD25⁻ e níveis de carga proviral em indivíduos portadores assintomáticos de HTLV-1 (PA) e pacientes com HAM/TSP. A análise estatística foi realizada com o teste de Spearman. Correlações consideradas estatisticamente significantes se $p < 0.05$.

Ao analisar níveis de carga proviral e frequência e número de células T CD4⁺ CD39⁺CD25⁺ (Treg), observamos que não há correlação seja em indivíduos portadores assintomáticos de HTLV-1 ou em pacientes HAM/TSP (Figura 13A,B).

Figura 13: Associação entre frequência (A) e número (B) de células T CD4⁺CD39⁺CD25⁺ e níveis de carga proviral em indivíduos portadores assintomáticos de HTLV-1 (PA) e pacientes HAM/TSP. A análise estatística foi realizada com o teste de Spearman. Não houve correlações significativas entre os valores analisados. Correlações consideradas estatisticamente significantes se $p < 0.05$.

Produção de IL-17 está reduzida em pacientes HAM/TSP

Pouco se sabe sobre a produção de IL-17 na infecção pelo HTLV-1. A indução da expressão de IL-17 mRNA foi observada em linhagens celulares infectadas por HTLV-1(108). Células Th17 têm um papel central em muitas doenças auto-imunes, incluindo esclerose múltipla (EM). Avaliou-se por ELISPOT a produção de IL-17 por CMSP estimuladas com PMA e ionomicina de 18 pacientes portadores de HTLV-1 (8 portadores

assintomáticos e 10 HAM/TSP) e 9 indivíduos não infectados (CN). Encontramos um número significativamente menor de células produtoras de IL-17 entre pacientes HAM/TSP em comparação com indivíduos não infectados. Embora não seja estatisticamente significativa, uma tendência à redução da produção de IL-17 foi encontrada entre pacientes HAM/TSP em relação aos portadores assintomáticos (PA) (Figura 14).

Figura 14: Secreção de IL-17 de CMSP medida por ELISPOT. Experimentos realizados em duplicata. Resultados finais normalizados para 10^6 CMSP após subtração dos valores encontrados nos poços não estimulados. As barras representam a mediana dos valores. Análise estatística realizada através do teste de Mann-Whitney. Diferenças consideradas estatisticamente significantes se $p < 0.05$.

No contexto da infecção por retrovírus, demonstrou-se que as células Th17 estão depletadas na infecção por HIV(109). A relação Th17:Treg reduzida nessa infecção está ligada à progressão da doença devido ao aumento dos níveis de IFN- γ e atividade da indoleamina 2,3-dioxigenase 1 (IDO1)(110). Em pacientes com HAM/TSP, demonstrou-se a atividade aumentada de IDO1 no LCR em comparação com indivíduos com outras alterações neurológicas não associadas à infecção pelo HTLV-1(111), o que pode estar relacionado à diminuição do número de células Th17.

Encontramos uma redução significativa na razão Th17/Treg em pacientes HAM/TSP em comparação com portadores assintomáticos, considerando o número de células secretoras de IL-17 e o número de células T CD4⁺CD39⁺CD25⁺, (Figura 15).

Figura 15: Razão entre número de células secretoras de IL-17 e células Treg (CD25⁺CD39⁺), identificadas na população de linfócitos T CD4⁺. As barras representam a mediana de valores. Análise estatística realizada através do teste de Mann-Whitney. Diferenças consideradas estatisticamente significantes se $p < 0.05$.

Produção de IL-17 e IFN- γ em pacientes HAM/TSP

Após identificar redução na produção de IL-17 em CMSP de pacientes com HAM/TSP, analisamos a produção de IL-17 e IFN- γ por subpopulações de células T CD4⁺ neste mesmo grupo.

Avaliamos por citometria de fluxo a produção de IL-17 e IFN- γ por células T CD4⁺ estimuladas com PMA e ionomicina e controles sem estímulo de 18 pacientes portadores de HTLV-1 (8 portadores assintomáticos e 10 HAM/TSP) e 9 indivíduos não infectados (CN). Não houve produção espontânea de citocinas nas amostras não estimuladas (dados não mostrados). Observamos aumento significativo da produção de IFN- γ em células T CD4⁺CD39⁺CD25⁺ em pacientes HAM/TSP quando comparados a

indivíduos não infectados e portadores assintomáticos de HTLV-1 (Figura 16A). A produção de IFN- γ também está aumentada em células T CD4⁺CD39⁺CD25⁻ de pacientes HAM/TSP comparados a indivíduos não infectados (Figura 16A). Encontramos ainda uma frequência significativamente menor de células T CD4⁺CD39⁻CD25⁺ produtoras de IL-17 em pacientes HAM/TSP em comparação com indivíduos não infectados (Figura 16B), compatíveis com os dados observados nos ensaios de Elispot.

Figura 16: Detecção de IFN- γ (A) e IL-17 (B) em subpopulações de células T CD4⁺ de acordo com a expressão de CD25 e CD39 em indivíduos não infectados, portadores assintomáticos de HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP. As colunas representam a mediana da frequência de células produtoras de IFN- γ (A) ou IL-17 (B) em cada subgrupo de células T CD4⁺. Análise estatística realizada através do teste de Mann-Whitney. Diferenças consideradas estatisticamente significantes se $p < 0.05$.

Discussão

Células T CD4⁺ desempenham papel fundamental na regulação da resposta imune e em doenças inflamatórias. Até a descrição das células T reguladoras e das células Th17(84, 112, 113), acreditava-se que a ativação celular decorrente da presença de um antígeno basicamente induziria a diferenciação das células T CD4⁺ Th1 ou Th2(114), baseado no paradigma postulado ainda na década de 80 após resultados em modelos animais(115). A maior diversidade de subgrupos celulares tornou o entendimento dos mecanismos de regulação da resposta imune mais preciso e, ao mesmo tempo, mais complexo. Enquanto condições auto-imunes antes não explicadas pelo paradigma Th1/Th2 eram esclarecidas à luz do conhecimento sobre Th17(116), novas informações por vezes contraditórias surgiam. Dois subgrupos com funções divergentes, células T CD4⁺ reguladoras (Treg) e células Th17, são derivadas de uma mesma célula progenitora(117). Alteração na homeostase destes dois subgrupos tem sido relacionada à patogênese de doenças crônicas inflamatórias e auto-imunes como, por exemplo, AIDS e esclerose múltipla(99, 110), mas ainda há lacunas no entendimento da patogênese destas condições.

Discute-se há mais de 30 anos a existência de um subgrupo celular capaz de induzir linfoproliferação em um processo denominado “contrassupressão”, definida como a oposição à atividade supressora das células Treg, mas a identificação e caracterização destas células não havia sido realizada(118, 119). Neste estudo, descrevemos e caracterizamos um subgrupo de células T CD4⁺ que expressam a ectoenzima CD39 e apresentam capacidade imunoestimuladora que denominamos de células T indutoras (Tind). CD39 foi recentemente sugerida por caracterizar como um marcador de células Treg em camundongos e humanos(97). Sua ação parece estar relacionada à capacidade de hidrólise de ATP e ADP(120). A presença de ATP no meio extracelular é detectada por receptores purinérgicos expressos em células epiteliais, monócitos e células dendríticas, resultando na secreção de IL-1 β e na maturação de células

dendríticas, contribuindo para a indução do processo inflamatório(121, 122). Entretanto, ATP e metabólitos decorrentes de sua hidrólise têm efeitos paradoxais, podendo atuar como fatores inibitórios ou estimuladores do processo inflamatório(123). Essa ambiguidade sugere que a expressão de CD39 pode não representar exclusivamente capacidade supressora(124). Ademais, CD39 foi descrito inicialmente como um marcador de ativação de células linfóides(125). A caracterização de células com capacidade imunoestimuladora que expressam CD39 sugere que, apesar de ser um marcador de células T com capacidade supressora em combinação com outros marcadores como CD25 e FoxP3, a ectoenzima CD39 também pode ser usada como marcador de um subgrupo de células T CD4⁺ que possuem capacidade de induzir e potencializar atividade de células T. Esta capacidade se reflete na indução de proliferação e produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺, o que ocorreu dependente da concentração de células nas condições de cultura, simulando uma curva de dose-resposta. Sugerimos que as Tind estimulam uma população específica de linfócitos T e atuam na contração das células Treg, provavelmente buscando equilibrar a resposta imune celular(10).

Não foi possível definir se CD39 contribui diretamente com a capacidade de imunoestimulação ou se é apenas um biomarcador deste subgrupo celular. Apesar de os experimentos com anticorpo monoclonal CD39 demonstrarem apenas redução parcial da capacidade funcional das células Tind, não podemos excluir que CD39 contribui para sua função. A ectoenzima CD39 pode se expressar de duas formas de acordo com seus dois domínios transmembrana, com variação significativa de suas propriedades enzimáticas(126). Estudos sobre a composição estrutural em diferentes subgrupos de células T CD4⁺ podem contribuir para o conhecimento de sua função.

Diante da caracterização de um padrão funcional inédito, acreditamos que as células Tind representem um novo subgrupo de células T CD4⁺. Entretanto, é necessário determinar se há um padrão de fatores de transcrição em Tind que coincida com Th1 (T-bet, STAT1), Th2 (GATA-3,

STAT6) e Th17 (ROR γ t) ou se há um padrão específico que caracterize um subgrupo celular distinto. Além disso, a identificação de outras moléculas neste subgrupo celular pode contribuir para uma caracterização mais precisa desta subpopulação.

Após os resultados deste trabalho, que foram publicados recentemente(10), abriu-se um novo campo de investigação, que foi verificar o comportamento das Tind, em contrabalanço às Treg, em diversas situações clínicas. Em especial, há o interesse de avaliar o comportamento destas subpopulações de células T CD4⁺ em condições onde predominam a ativação ou o caráter proliferativo de linfócitos.

Considerando o contexto pró-inflamatório associado à infecção pelo HTLV-1, formulamos a hipótese que as Tind podem ter papel importante na patogênese da síndrome neurodegenerativa denominada HAM/TSP. Analisamos, então, a carga proviral dos pacientes infectados pelo HTLV-1, fator predisponente à produção de IFN- γ , TNF- α entre outras citocinas e ao desenvolvimento de HAM/TSP(59). Investigamos a produção de IL-17, outra citocina inflamatória com papel importante nas síndromes neurodegenerativas inflamatórias como esclerose múltipla e pouco estudada em pacientes infectados pelo HTLV-1.

A maior concentração de indivíduos com HAM/TSP entre a quinta e sexta décadas de vida e a maior prevalência no sexo feminino ilustram a representatividade de nossa coorte. Dados demográficos da coorte de Kagoshima relatam prevalência do gênero feminino desta síndrome de aproximadamente 2:1(61). Apesar de não ser usada com objetivo diagnóstico, a carga proviral é um dos principais diferenciais laboratoriais entre infectados pelo HTLV-1, sendo considerada por modelos matemáticos como importante fator de risco para o desenvolvimento de HAM/TSP(59). A diferença significativa de carga proviral encontrada entre os indivíduos assintomáticos e HAM/TSP corrobora as semelhanças de nossa coorte com os dados disponíveis na bibliografia.

Diversos fatores de transcrição e a expressão de proteínas como FoxP3 e ectoenzima CD39 foram identificados como marcadores de células

T CD4⁺ reguladoras (Treg)(10, 82, 97-99, 107, 127). Posteriormente, verificou-se que ainda não temos um único marcador específico para Tregs em humanos, visto que células T ativadas também podem expressá-los em diferentes combinações e intensidade. Assim como CD25 e outras proteínas celulares, a expressão de CD39 pode ser induzida por estímulo inespecífico *in vitro*, o que sugere que o aumento da expressão deste marcador também pode estar associado ao meio pró-inflamatório encontrado em HAM/TSP e outras doenças inflamatórias crônicas e auto-imunes. Isso poderia explicar a maior frequência de células T CD4⁺ que expressam CD39 na infecção pelo HTLV-1. As diferenças encontradas na frequência dos subgrupos celulares de acordo com a expressão de CD25 e CD39 combinadas à expressão uniforme de FoxP3 em Treg e ausente em Tind sugerem que as frequências aumentadas destes subgrupos celulares descritas na infecção pelo HTLV-1 não estão, todavia, associadas apenas ao aumento da expressão de CD39. A maior frequência de Tregs que expressam FoxP3 reforça a idéia que o aumento de células Treg na infecção pelo HTLV-1 é consistente, mesmo se consideradas diferentes estratégias fenotípicas de análise ou diferentes subgrupos de células Treg.

O aumento da frequência de Tregs em pacientes infectados pelo HTLV-1 pode refletir a tentativa de controlar a ativação celular e linfoproliferação características desta infecção crônica. Diversos fatores podem interferir na eficácia de Treg em desempenhar seu papel regulador. Apesar da frequência aumentada de Treg, a infecção pelo HTLV-1 pode alterar sua capacidade reguladora como já demonstrado anteriormente(92). Além disso, o aumento significativo de Tind verificado apenas em pacientes HAM/TSP pode antagonizar o efeito supressor das Tregs, contribuindo para o desenvolvimento do processo inflamatório e consequentemente, para o desenvolvimento de HAM/TSP. Devemos considerar que estas alterações podem ser decorrentes do desenvolvimento de HAM/TSP e não necessariamente a causa deste quadro clínico. Para confirmar estas hipóteses, análise funcional com co-culturas destes subgrupos celulares são

necessárias além de estudos pré e pós-infecção que avaliem alterações na capacidade funcional destas subpopulações.

Valores aumentados de carga proviral em pacientes HAM/TSP comparados a portadores assintomáticos de HTLV-1 representam o principal diferencial laboratorial entre estes dois grupos. Diversos estudos analisaram a correlação entre a frequência de células Treg, capacidade lítica e frequência de células T CD8⁺ HTLV-1-específicas (CTL) e carga proviral(74, 76, 94, 128). Dois achados representam a importância deste subgrupo celular na resposta ao HTLV-1: a maior frequência de CTLs em pacientes HAM/TSP na tentativa de controle da atividade viral e a correlação negativa entre a capacidade lítica das CTLs e os níveis de carga proviral em pacientes infectados pelo HTLV-1 independentemente da condição clínica. Estes dados sugerem que a resposta de células T CD8⁺ a antígenos virais tem importante papel na redução da carga proviral e possivelmente no desfecho clínico da infecção pelo HTLV-1. Por outro lado, esta correlação é vista tanto em pacientes assintomáticos como em HAM/TSP e se comparadas CTLs com capacidades líticas equivalentes, a carga proviral entre pacientes HAM/TSP é maior quando comparados a portadores assintomáticos, sugerindo que outros fatores, como por exemplo, o nível de proliferação de células T CD4⁺, possam estar associados a esta diferença nos valores de carga proviral. A correlação direta entre células Tind e carga proviral em pacientes HAM/TSP sugere que a maior frequência deste subgrupo celular possa ser um dos fatores que contribuem para uma maior proliferação de células T CD4⁺ e consequentemente, maiores valores de carga proviral nestes indivíduos.

O eixo comum de diferenciação de células Th17 e Treg e as alterações evidenciadas em doenças autoimunes sugerem que o balanço entre estas subpopulações possa determinar a persistência do processo inflamatório no sistema nervoso central (SNC)(129). Células Th17 secretam IL-17, uma citocina pró-inflamatória com papel fundamental na resposta a bactérias extracelulares e fungos(130). Além disso, células Th17 estão envolvidas na patogênese de doenças inflamatórias crônicas e

autoimunes(131). Estudos em encefalite autoimune experimental (EAE), o modelo animal para EM e HAM/TSP, demonstram a importância das células Th17 na patogênese do processo neuro-inflamatório. IL-17 é um fator importante para que ocorra a ruptura da barreira hemato-encefálica e a infiltração de células T no SNC. Entretanto, a neutralização de IL-17 em camundongos com EAE ocasionou uma melhora apenas parcial do processo neuro-inflamatório(132), sugerindo a participação de múltiplos fatores na patogênese e intensidade da EAE.

Em pacientes com EM, o processo de auto-imunidade não pode ser explicado pela ação isolada de um subgrupo celular ou de uma citocina. Aparentemente, a interação entre células Th1, Th17 e Treg, entre outros fatores, determinam intensidade e localização do processo inflamatório(133). A razão entre células Th1 e Th17 são determinantes se o processo inflamatório autoimune ocorre no parênquima cerebral ou na medula espinhal em pacientes com EM. Um maior número de células Th17 nestes pacientes favorece a ocorrência de lesões cerebrais. Lesões medulares, entretanto, ocorrem independente da razão entre células Th17 e Th1. Além disso, células T reguladoras CD39⁺ possuem importante papel na prevenção de processos auto-imunes ao suprimir a produção de IL-17, mas esta função está alterada em pacientes com EM(99). Lesões parenquimatosas são comuns na EM mas relativamente infrequentes em HAM/TSP. É possível que o reduzido número de células produtoras de IL-17 em pacientes HAM/TSP relacione-se com a topografia medular das lesões neurológicas destes pacientes.

Há relatos de níveis aumentados de mRNA de IL-17 em pacientes infectados por HTLV-1 com periodontite(134) e em linhagens celulares infectadas(108). Por outro lado, a frequência de células produtoras de IL-17 está diminuída em pacientes HAM/TSP comparados a controles não infectados(135), quando foram avaliados linfócitos T CD4⁺ CD25⁺CCR4⁺. Nossos dados mostram que o número de células Th17 está reduzido no sangue periférico de pacientes HAM/TSP mas não entre PA quando comparados a controles não infectados. Seria fundamental avaliar a

presença de células Th17 no SNC destes pacientes para confirmar que, apesar das semelhanças clínicas, a participação desta subpopulação na patogênese das alterações inflamatórias vistas em HAM/TSP não é relevante como a que ocorre na EM.

É possível que exista uma relação entre a maior frequência de células Treg e a observada menor produção de IL-17 em pacientes com HAM/TSP. Esta hipótese é reforçada pela menor razão Th17/Treg, representada na Figura 15. Por outro lado, não há como definir, baseado nos nossos resultados, qual seria a causa e a consequência desta possível interação. São necessários estudos adicionais, incluindo avaliações funcionais da interação entre ambas para ajudar a esclarecer os mecanismos de controle da ativação celular, desenvolvimento de processos inflamatórios e resposta proliferativa, todos vistos na HAM/TSP.

Em um estudo de Favre e colaboradores (2010), foi demonstrado que a redução da razão Th17/Treg está relacionada a progressão da doença por HIV e a ativação imunológica(110). De forma elegante, eles demonstraram os efeitos inibitórios dos metabólitos de triptofano gerados pela atividade de IDO1 na frequência de células Th17 nos pacientes infectados pelo HIV-1. IDO1 desempenha papel fundamental no catabolismo do triptofano através da via da kinurenina e é ativada por interferons(136). Demonstrou-se anteriormente que os produtos resultantes da atividade da IDO1 induzem a expressão de FoxP3 e inibem a expressão de RORc, gene regulatório da diferenciação das células Th17(137, 138). O único relato que avalia a atividade de IDO1 em pacientes HAM/TSP descreve altos níveis de kinurenina no liquor cefalorraquidiano destes indivíduos, sugerindo um papel para a atividade de IDO1 em HAM/TSP(111). Nossos dados evidenciam uma redução significativa de Th17 combinada a uma frequência aumentada de células T reguladoras entre pacientes HAM/TSP. Postulamos que o desequilíbrio Th17/Treg possa estar relacionado à hiperatividade de IDO1 derivado dos altos níveis de interferon- γ e ao estímulo do fator de transcrição NF- κ B vistos em pacientes infectados pelo HTLV-1.

A descrição de uma nova subpopulação de células T capazes de induzir proliferação abre novas perspectivas na análise da homeostase imunológica. Em doenças com importante componente inflamatório como HAM/TSP e EM, células Tind podem desempenhar papel importante na patogênese.

Em conjunto, nossos experimentos foram capazes de definir um novo grupo de células T CD4⁺, as Tind, que estão significativamente aumentadas em pacientes HAM/TSP mas não em portadores assintomáticos de HTLV-1. Por outro lado, demonstramos o aumento das Treg em indivíduos infectados pelo HTLV-1 independentemente do quadro clínico. A queda na produção de IL-17 e aumento na produção de IFN- γ especificamente por células T CD4⁺ com fenótipo regulador (CD39⁺CD25⁺) apontam para um distúrbio nos processos que regulam a ativação celular, inflamação e proliferação linfocitária. Embora a rede de funcionamento desse sistema precise ser ainda elucidada, acreditamos que possa ter a resposta para o desenvolvimento de métodos que auxiliem no diagnóstico da instalação da doença e identificação de alvos terapêuticos.

Conclusões

1. Identificamos uma nova subpopulação de células T CD4⁺, com fenótipo CD25⁻CD39⁺, capazes de induzir proliferação celular e produção de citocinas inflamatórias, que denominamos Tind.
2. Pacientes com HAM/TSP apresentam frequência aumentada de Tind comparados a portadores assintomáticos de HTLV-1, sugerindo um papel no processo inflamatório crônico visto nesta condição neurológica relacionada ao HTLV-1.
3. Reforçamos o conceito que há um aumento da frequência de Treg na infecção pelo HTLV-1 possivelmente como processo reacional devido à conhecida ativação celular e linfoproliferação induzidas pela infecção.
4. A carga proviral aumentada em pacientes HAM/TSP correlaciona-se diretamente com a frequência e o número de células Tind, o que não ocorre em portadores assintomáticos de HTLV-1.
5. A significativa redução na produção de IL-17 pelos pacientes HAM/TSP contrasta com o aumento desta citocina verificado em pacientes com esclerose múltipla, condição neurodegenerativa com diversas semelhanças clínicas.
6. A diminuição da razão Th17/Treg vista apenas nos pacientes com HAM/TSP quando comparados a indivíduos não infectados ilustra as alterações na imunoregulação relacionada à doença.
7. O aumento da produção de IFN- γ por células Treg e Tind de pacientes HAM/TSP corrobora o conceito de perda da capacidade reguladora e sugere contribuição de Tind para a atividade inflamatória característica desta condição clínica.

Anexos

Anexo 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1 – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO OU RESPONSÁVEL LEGAL:

NOME DO PACIENTE:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE N.º:

SEXO: DATA NASC.:

ENDEREÇO:

N.º

APTO:

BAIRRO:

CIDADE:

CEP.:

TELEFONE:

2 – Responsável legal:

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc)

Documento de identidade: _____ Sexo: M ☐ F ☐

Data Nascimento: _____

Endereço:

N _____ Apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: DDD (

) _____

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CLÍNICA

Título: “Análise funcional de linfócitos T CD4+ de pacientes co-infectados pelo HIV-1 e HTLV-I”

PESQUISADOR: Dr. Esper Georges Kallas

CARGO/FUNÇÃO: PESQUISADOR

INSC. CONS. REGIONAL N.º:

CRM/SP 67395

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Investigação Médica 60 (LIM-60)

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

SEM RISCO ☐

RISCO MÍNIMO ☒

RISCO MÉDIO ☐

RISCO MAIOR ☐

DURAÇÃO DA PESQUISA: 3 anos

1 Desenho do Estudo e Objetivos

O objetivo deste estudo é avaliar um tipo de célula que faz parte do sistema de defesa do corpo, os linfócitos T CD4⁺, em pessoas que tem a infecção pelo HIV-1 (o vírus causador da AIDS) e o HTLV-I (outro vírus que pode causar algumas doenças), além de pessoas que não têm esses vírus.

A infecção pelo HIV-1 causa alterações no sistema de defesa, assim como a infecção por HTLV-1. Os linfócitos T CD4⁺, sofrem ação direta de ambos os vírus de formas diferentes. Estas diferenças ainda não foram completamente elucidadas e um melhor entendimento das interações entre ambos os vírus e o sistema imunológico é fundamental, com possíveis repercussões no cuidado e tratamento dessas pessoas.

Os linfócitos T CD4⁺ são células com diversas funções no mecanismo de defesa do sistema imunológico tanto pela sua ação direta sobre germes como pela influência que exerce sobre outras células do corpo. O número de linfócitos T CD4⁺ é um dos marcadores utilizados para avaliar a condição do sistema imunológico humano. O HIV-1 leva a uma diminuição do número de linfócitos T CD4⁺, sendo este um dos principais mecanismos pelo qual o vírus causa a deficiência imunológica. O HTLV-1 tem ação oposta ao HIV-1 e leva a um aumento do número de linfócitos T CD4⁺. É possível que a ação conjunta dos vírus sobre este grupo de células leve a um aumento no número de linfócitos T CD4⁺ mas com sua função comprometida. Iremos realizar testes em laboratório em amostras de sangue de voluntários.

Você pode ser incluído em um dos seguintes grupos de voluntários:

- Pessoas que têm teste negativo para o HIV-1 e HTLV-1 sem problemas de saúde aparentes
- Pessoas que têm teste positivo para HIV-1
- Pessoas que têm teste positivo para HTLV-1
- Pessoas que têm teste positivo para ambos os vírus (HIV-1 e HTLV-1)

2. Procedimentos da pesquisa

Após ter sido esclarecido sobre o estudo, você poderá decidir se deseja ou não participar. Se decidir participar, você será solicitado a assinar o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** ou colocar suas impressões digitais em frente a uma testemunha de sua confiança. Uma cópia deste documento lhe será fornecida. Sua participação consistirá de duas visitas semestrais onde será realizada uma consulta médica para obter dados clínicos a serem analisados conjuntamente aos resultados dos testes laboratoriais realizados com 90ml de sangue (equivalente a um terço de um copo de requeijão) coletados por punção periférica de veia no antebraço (procedimento rotineiro).

3. Relação dos procedimentos

Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, coleta de 90 ml através de acesso venoso periférico em antebraço

4. Riscos e desconfortos esperados

Os riscos relacionados com sua participação são mínimos. Algumas pessoas referem dor no local da punção venosa e sensação de desmaio e raramente ocorrem complicações como formação de hematomas ou infecções locais.

5. Vantagens na participação deste estudo

Não existe nenhum benefício direto a você por participar neste estudo, mas as informações obtidas de sua participação poderão beneficiar no futuro outras pessoas dependendo das conclusões do estudo.

Você não terá despesas pessoais incluindo exames e consultas. Despesas adicionais serão absorvidas pelo orçamento da pesquisa. Não haverá compensação financeira.

6. Procedimentos alternativos e/ou experimentais

Você não será submetido a nenhum procedimento experimental neste estudo. Como não se trata de estudo relacionado a possíveis tratamentos, não existem procedimentos alternativos a serem descritos.

7. Garantia de acesso aos pesquisadores

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os pesquisadores do estudo são os Drs. Fábio Eudes Leal e Esper Georges Kallás, que podem ser encontrados na Rua Dr Arnaldo, 455 3 andar, SP. Tel: 30618314 e 30618315. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225-5º andar, tel: 30696442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX 3069 6442 ramal 26 São Paulo - SP e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8. Voluntariedade

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9. Direito de Confidencialidade

A confidencialidade das informações obtidas nesse estudo será garantida e os dados obtidos serão analisados em conjunto com os de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação do voluntário. Sua participação neste estudo é confidencial e sigilosa. A menos que seja exigido por lei, somente a equipe de estudo, Comitês de Ética em Pesquisa e Investigadores das agências regulatórias governamentais poderão ter acesso direto aos registros médicos para verificar as informações do estudo. O material e dados coletados durante este projeto só será utilizado para esta pesquisa.

10. Direito de ser mantido atualizado quanto aos resultados da pesquisa

Os dados obtidos com a realização deste estudo estarão à disposição dos voluntários sem que o sigilo de cada participante seja prejudicado.

11. Despesas e Compensações

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal com nexo causal comprovado, o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

12. Compromisso do pesquisador

Materiais e dados obtidos serão utilizados somente para estudo e publicações científicas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu discuti com o Dr. Esper Georges Kallas ou Dr Fabio Eudes Leal sobre minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros pra mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e

riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos pertinentes. 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 poderie 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.

Assinatura do paciente/representante legal

Data

Assinatura da testemunha

Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participacao neste estudo

Prof. Dr. Éspér Georges Kallás

Data

Pesquisador responsável

Anexo 2 Ficha de Dados Clínico-laboratoriais

1. Identificação

Nome: _____

Telefone residência: _____

Celular: _____

E-mail: _____

RH: _____

Data de Nascimento: ____/____/____

Sexo: () Masculino () Feminino

2. Grupo:

() Controle com Sorologias Negativas para HIV e HTLV

() HTLV -1 + assintomático

() HAM/TSP

() HIV -1 +

() HTLV -1+ e HIV-1+

3. Exames Laboratoriais de Triagem: (*) critérios de exclusão

3.1 Hepatite B Data: ____/____/____

() Não exposto () Vacinado () Exposição Pregressa *() HBsAg+

3.2 Hepatite C Data: ____/____/____

ELISA () Negativo () Positivo

PCR () Negativo *() Positivo

3.3 Doença de Chagas Data: ____/____/____

ELISA () Negativo *() Positivo

3.4 Sífilis Data: ____/____/____

VDRL () Negativo *() Positivo

Elisa () Negativo () Positivo

3.5 Tuberculose Data: ____/____/____

PPD () não reator () fraco reator *() forte reator *() doença ativa

3.6 HTLV 1/2

ELISA () Negativo () Positivo

Data do 1º exame positivo: ____/____/____

3.6.1 Se positivo:

Western Blot: obrigatórios para confirmação em negrito (HTLV-1)

() **gd21** () **p19** () p24 () p26 () p28 () p32

() rgp46 () **rgp46I** () rgp46II

3.6.2 Se W.B. indeterminado

PCR:

() Positivo () Negativo () Não realizado

3.7 HIV

ELISA () Negativo () Positivo

Data do 1º exame positivo: ____/____/____

PCR () Negativo () Positivo

3.8 Hemograma

Data: ____/____/____

Hb : ____ g/dL

Leucócitos totais : ____

Linfócitos : ____ Porcentagem: ____%

Eosinófilos : ____ Porcentagem: ____%

Plaquetas : ____

3.9 Exames Imunológicos e virais:

Data	____/____/____	____/____/____	____/____/____
Células CD4 cél/μL			
Carga Viral HIV-1 cópias/ml			
Carga Viral HIV-1 log			
CPV HTLV-1 cópias/1000cél			

4. Dados Relativos à Infecção pelo HTLV-1 () Não se aplica (HTLV -)

4.1 Sinais e sintomas primários relacionados à infecção pelo HTLV-1:

(1) Paresia mmii crônica progressiva (6) Lombalgia

(2) Espasticidade (7) Mialgia

-
(3) Hiperreflexia	(8) Distúrbios urinários
(4) Parestesias	(9) Disfunção erétil
(5) Síndrome piramidal	(10) Constipação
(Babinski e/ou clônus)	(11) Assintomático(a)

4.2 Manifestações clínicas possivelmente relacionadas ao HTLV-I:

(1) Artropatia	(4) Xerose cutânea
(2) Uveíte	(5) Sd. Sjögren / Sicca
(3) Polimiosite / Miopatia	(6) Estrongiloidíase
- Último episódio ____/____/____

4.3 Líquor Data: ____/____/____

ELISA HTLV – 1/2: () Positivo () Negativo

Hemácias: _____

Leucócitos: _____

Linfomononucleares: _____%

Proteína: _____

Glicose: _____

4.4 RNM Coluna Torácica:

Compressão Extrínseca: () Não () Sim

Atrofia Medular: () Não () Sim

Hipersinal em T2: () Não () Sim

4.5 Pulsoterapia (Metilprednisolona 1g EV ao dia por 3 dias):

() Não

() Sim Data: ____/____/____

5. Dados Relativos à Infecção pelo HIV-1

5.1 Caso AIDS: () Sim () Não

5.2 Doença definidora: () Sim () Não Data: ____/____/____

5.3 Em algum momento CD4 < 200: () Sim () Não

5.4 Em uso de ARVs: () Sim () Não Início:

____/____/____

5.4.1 Esquema em uso inclui AZT, 3TC ou TDF: () Sim () Não

5.5 Menor contagem de células CD4: _____ células/ μ L

Referências

1. Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*. 1977 Sep;50(3):481-92.
2. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980 Dec;77(12):7415-9.
3. Osame M, Igata A. The history of discovery and clinico-epidemiology of HTLV-I-associated myelopathy(HAM). *Jpn J Med*. 1989 May-Jun;28(3):412-4.
4. Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 1985 Aug 24;2(8452):407-10.
5. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*. 1986 May 3;1(8488):1031-2.
6. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*. 1982 Nov 5;218(4572):571-3.
7. Araujo A, Hall WW. Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. *Ann Neurol*. 2004 Jul;56(1):10-9.
8. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983 May 20;220(4599):865-7.
9. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983 May 20;220(4599):868-71.
10. Ndhlovu LC, Leal FE, Eccles-James IG, Jha AR, Lanteri M, Norris PJ, et al. A novel human CD4+ T-cell inducer subset with potent immunostimulatory properties. *Eur J Immunol*. 2010 Jan;40(1):134-41.
11. Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, Holding-Cobham M, Cranston B, Malley K, et al. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. *Am J Epidemiol*. 1991 Jun 1;133(11):1114-24.
12. Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Castro-Costa CM, Murphy EL, Sabino EC, Hisada M, et al. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. *Rev Panam Salud Publica*. 2006 Jan;19(1):44-53.
13. Galvao-Castro B, Loures L, Rodriques LG, Sereno A, Ferreira Junior OC, Franco LG, et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*. 1997 Feb;37(2):242-3.
14. Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, da Gloria Teixeira M, Galvao-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003 Dec 15;34(5):527-31.

-
15. Dourado I, Andrade T, Galvao-Castro B. HTLV-I in Northeast Brazil: differences for male and female injecting drug users. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1998 Dec 1;19(4):426-9.
 16. Wiktor SZ, Pate EJ, Murphy EL, Palker TJ, Champegnie E, Ramlal A, et al. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Jamaica: association with antibodies to envelope glycoprotein (gp46) epitopes. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1993 Oct;6(10):1162-7.
 17. Okochi K, Sato H, Hinuma Y. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang.* 1984;46(5):245-53.
 18. Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, Brathwaite A, Holding-Cobham M, Waters D, et al. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Intern Med.* 1989 Oct 1;111(7):555-60.
 19. Okochi K, Sato H. Transmission of adult T-cell leukemia virus (HTLV-I) through blood transfusion and its prevention. *AIDS Res.* 1986 Dec;2 Suppl 1:S157-61.
 20. Portaria nº 1376, de 19 de novembro de 1993. Aprovação de normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, (1993).
 21. Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology.* 2005;2:30.
 22. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 May 31;102(22):7994-9.
 23. Mahieux R, Gessain A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: new members of the HTLV family. *Pathol Biol (Paris).* 2009 Mar;57(2):161-6.
 24. Robek MD, Ratner L. immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants expressed in a functional molecular clone. *J Virol.* 1999 Jun;73(6):4856-65.
 25. Zinkernagel RM, Hengartner H. T-cell-mediated immunopathology versus direct cytolysis by virus: implications for HIV and AIDS. *Immunol Today.* 1994 Jun;15(6):262-8.
 26. Miura T, Fukunaga T, Igarashi T, Yamashita M, Ido E, Funahashi S, et al. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Feb 1;91(3):1124-7.
 27. Shimotohno K, Takahashi Y, Shimizu N, Gojobori T, Golde DW, Chen IS, et al. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 May;82(10):3101-5.
 28. Bartoe JT, Albrecht B, Collins ND, Robek MD, Ratner L, Green PL, et al. Functional role of pX open reading frame II of human T-lymphotropic virus type 1 in maintenance of viral loads in vivo. *J Virol.* 2000 Feb;74(3):1094-100.
 29. Younis I, Green PL. The human T-cell leukemia virus Rex protein. *Front Biosci.* 2005 Jan 1;10:431-45.
 30. Gaudray G, Gachon F, Basbous J, Biard-Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard JM. The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA

-
- genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J Virol*. 2002 Dec;76(24):12813-22.
31. Kannian P, Green PL. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses*. 2010 Sep;2(9):2037-77.
 32. Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell*. 2003 Nov 14;115(4):449-59.
 33. Jones KS, Petrow-Sadowski C, Bertolette DC, Huang Y, Ruscetti FW. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *J Virol*. 2005 Oct;79(20):12692-702.
 34. Ghez D, Lepelletier Y, Lambert S, Fourneau JM, Blot V, Janvier S, et al. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol*. 2006 Jul;80(14):6844-54.
 35. Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira J, Iwamasa T, et al. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*. 1993 Sep;196(1):25-33.
 36. Macatonia SE, Cruickshank JK, Rudge P, Knight SC. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1992 Sep;8(9):1699-706.
 37. Nagai M, Brennan MB, Sakai JA, Mora CA, Jacobson S. CD8(+) T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1858-61.
 38. Ijichi S, Ramundo MB, Takahashi H, Hall WW. In vivo cellular tropism of human T cell leukemia virus type II (HTLV-II). *J Exp Med*. 1992 Jul 1;176(1):293-6.
 39. Jones KS, Fugo K, Petrow-Sadowski C, Huang Y, Bertolette DC, Lisinski I, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *J Virol*. 2006 Sep;80(17):8291-302.
 40. Ghez D, Lepelletier Y, Jones KS, Pique C, Hermine O. Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. *Retrovirology*. 2010;7:99.
 41. Franchini G, Nicot C, Johnson JM. Seizing of T cells by human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1. *Adv Cancer Res*. 2003;89:69-132.
 42. Chen LF, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 May;5(5):392-401.
 43. Yasunaga J, Matsuoka M. Leukemogenesis of adult T-cell leukemia. *Int J Hematol*. 2003 Nov;78(4):312-20.
 44. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991 Jul 5;253(5015):49-53.
 45. Matsuoka M, Green PL. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology*. 2009;6:71.
 46. Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, Griffiths GM, et al. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science*. 2003 Mar 14;299(5613):1713-6.
 47. Mochizuki M, Watanabe T, Yamaguchi K, Tajima K, Yoshimura K, Nakashima S, et al. Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical, and virologic studies. *J Infect Dis*. 1992 Oct;166(4):943-4.

-
48. Beilke MA, Traina-Dorge V, England JD, Blanchard JL. Polymyositis, arthritis, and uveitis in a macaque experimentally infected with human T lymphotropic virus type I. *Arthritis Rheum.* 1996 Apr;39(4):610-5.
 49. Arisawa K, Soda M, Endo S, Kurokawa K, Katamine S, Shimokawa I, et al. Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan. *Int J Cancer.* 2000 Feb 1;85(3):319-24.
 50. Carneiro-Proietti AB, Sabino E, Leao S, Salles N, Loureiro P, Sarr M, et al. HTLV-1 and -2 seroprevalence, incidence and residual transfusion risk among blood donors in Brazil during 2007-2009. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2012 Feb 12.
 51. Orland JR, Engstrom J, Fridey J, Sacher RA, Smith JW, Nass C, et al. Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. *Neurology.* 2003 Dec 9;61(11):1588-94.
 52. Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol.* 1991 Nov;79(3):428-37.
 53. Kamihira S, Sugahara K, Tsuruda K, Minami S, Uemura A, Akamatsu N, et al. Proviral status of HTLV-1 integrated into the host genomic DNA of adult T-cell leukemia cells. *Clin Lab Haematol.* 2005 Aug;27(4):235-41.
 54. Mori N, Fujii M, Cheng G, Ikeda S, Yamasaki Y, Yamada Y, et al. Human T-cell leukemia virus type I tax protein induces the expression of anti-apoptotic gene Bcl-xL in human T-cells through nuclear factor-kappaB and c-AMP responsive element binding protein pathways. *Virus Genes.* 2001 Jun;22(3):279-87.
 55. Kawakami A, Nakashima T, Sakai H, Urayama S, Yamasaki S, Hida A, et al. Inhibition of caspase cascade by HTLV-I tax through induction of NF-kappaB nuclear translocation. *Blood.* 1999 Dec 1;94(11):3847-54.
 56. Brauweiler A, Garrus JE, Reed JC, Nyborg JK. Repression of bax gene expression by the HTLV-1 Tax protein: implications for suppression of apoptosis in virally infected cells. *Virology.* 1997 Apr 28;231(1):135-40.
 57. Hida A, Imaizumi M, Sera N, Akahoshi M, Soda M, Maeda R, et al. Association of human T lymphotropic virus type I with Sjogren syndrome. *Ann Rheum Dis.* 2010 Nov;69(11):2056-7.
 58. Montanheiro PA, Oliveira AC, Posada-Vergara MP, Milagres AC, Tauil C, Marchiori PE, et al. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Nov;38(11):1643-7.
 59. Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol.* 1998 Dec;4(6):586-93.
 60. Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, Izumo S, Nakagawa M, Osame M. Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 2000 Nov;182(5):1343-9.
 61. Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J, et al. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and

-
- the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 30;96(7):3848-53.
62. Vine AM, Witkovver AD, Lloyd AL, Jeffery KJ, Siddiqui A, Marshall SE, et al. Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis*. 2002 Oct 1;186(7):932-9.
63. Benveniste EN, Benos DJ. TNF-alpha- and IFN-gamma-mediated signal transduction pathways: effects on glial cell gene expression and function. *FASEB J*. 1995 Dec;9(15):1577-84.
64. Greten TF, Slansky JE, Kubota R, Soldan SS, Jaffee EM, Leist TP, et al. Direct visualization of antigen-specific T cells: HTLV-1 Tax11-19- specific CD8(+) T cells are activated in peripheral blood and accumulate in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 23;95(13):7568-73.
65. Benos DJ, McPherson S, Hahn BH, Chaikin MA, Benveniste EN. Cytokines and HIV envelope glycoprotein gp120 stimulate Na⁺/H⁺ exchange in astrocytes. *J Biol Chem*. 1994 May 13;269(19):13811-6.
66. Muller S, Boire G, Ossondo M, Ricchiuti V, Smadja D, Vernant JC, et al. IgG autoantibody response in HTLV-I-infected patients. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995 Dec;77(3):282-90.
67. Levin MC, Lee SM, Kalume F, Morcos Y, Dohan FC, Jr., Hasty KA, et al. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nat Med*. 2002 May;8(5):509-13.
68. Cross SL, Feinberg MB, Wolf JB, Holbrook NJ, Wong-Staal F, Leonard WJ. Regulation of the human interleukin-2 receptor alpha chain promoter: activation of a nonfunctional promoter by the transactivator gene of HTLV-I. *Cell*. 1987 Apr 10;49(1):47-56.
69. Azimi N, Brown K, Bamford RN, Tagaya Y, Siebenlist U, Waldmann TA. Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 3;95(5):2452-7.
70. Furuya T, Nakamura T, Fujimoto T, Nakane S, Kambara C, Shirabe S, et al. Elevated levels of interleukin-12 and interferon-gamma in patients with human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol*. 1999 Mar 1;95(1-2):185-9.
71. Goon PK, Biancardi A, Fast N, Igakura T, Hanon E, Mosley AJ, et al. Human T cell lymphotropic virus (HTLV) type-1-specific CD8+ T cells: frequency and immunodominance hierarchy. *J Infect Dis*. 2004 Jun 15;189(12):2294-8.
72. Hanon E, Hall S, Taylor GP, Saito M, Davis R, Tanaka Y, et al. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood*. 2000 Feb 15;95(4):1386-92.
73. Vine AM, Heaps AG, Kaftantzi L, Mosley A, Asquith B, Witkovver A, et al. The role of CTLs in persistent viral infection: cytolytic gene expression in CD8+ lymphocytes distinguishes between individuals with a high or low proviral load of human T cell lymphotropic virus type 1. *J Immunol*. 2004 Oct 15;173(8):5121-9.
74. Asquith B, Mosley AJ, Barfield A, Marshall SE, Heaps A, Goon P, et al. A functional CD8+ cell assay reveals individual variation in CD8+ cell antiviral

-
- efficacy and explains differences in human T-lymphotropic virus type 1 proviral load. *J Gen Virol*. 2005 May;86(Pt 5):1515-23.
75. Elovaara I, Koenig S, Brewah AY, Woods RM, Lehky T, Jacobson S. High human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific precursor cytotoxic T lymphocyte frequencies in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *J Exp Med*. 1993 Jun 1;177(6):1567-73.
76. Kubota R, Kawanishi T, Matsubara H, Manns A, Jacobson S. HTLV-I specific IFN-gamma+ CD8+ lymphocytes correlate with the proviral load in peripheral blood of infected individuals. *J Neuroimmunol*. 2000 Jan 24;102(2):208-15.
77. Matsuura E, Yamano Y, Jacobson S. Neuroimmunity of HTLV-I Infection. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2010 Sep;5(3):310-25.
78. Kubota R, Kawanishi T, Matsubara H, Manns A, Jacobson S. Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-specific CD8+ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection. *J Immunol*. 1998 Jul 1;161(1):482-8.
79. Ndhlovu LC, Leal FE, Hasenkrug AM, Jha AR, Carvalho KI, Eccles-James IG, et al. HTLV-1 tax specific CD8+ T cells express low levels of Tim-3 in HTLV-1 infection: implications for progression to neurological complications. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(4):e1030.
80. Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, et al. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med*. 2008 Nov 24;205(12):2763-79.
81. Umehara F, Izumo S, Nakagawa M, Ronquillo AT, Takahashi K, Matsumuro K, et al. Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1993 Jul;52(4):424-30.
82. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.
83. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol*. 2005 Apr;6(4):338-44.
84. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
85. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):287-96.
86. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*. 2002 Feb;16(2):311-23.
87. Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):303-10.

-
88. Burmeister Y, Lischke T, Dahler AC, Mages HW, Lam KP, Coyle AJ, et al. ICOS controls the pool size of effector-memory and regulatory T cells. *J Immunol.* 2008 Jan 15;180(2):774-82.
89. Arch RH. Function of tumor necrosis factor receptor family members on regulatory T-cells. *Immunol Res.* 2005;32(1-3):15-29.
90. Michaelsson J, Barbosa HM, Jordan KA, Chapman JM, Brunialti MK, Neto WK, et al. The frequency of CD127^{low} expressing CD4⁺CD25^{high} T regulatory cells is inversely correlated with human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) proviral load in HTLV-1-infection and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *BMC Immunol.* 2008;9:41.
91. Oh U, Grant C, Griffith C, Fugo K, Takenouchi N, Jacobson S. Reduced Foxp3 protein expression is associated with inflammatory disease during human t lymphotropic virus type 1 Infection. *J Infect Dis.* 2006 Jun 1;193(11):1557-66.
92. Yamano Y, Takenouchi N, Li HC, Tomaru U, Yao K, Grant CW, et al. Virus-induced dysfunction of CD4⁺CD25⁺ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *J Clin Invest.* 2005 May;115(5):1361-8.
93. Grant C, Oh U, Yao K, Yamano Y, Jacobson S. Dysregulation of TGF-beta signaling and regulatory and effector T-cell function in virus-induced neuroinflammatory disease. *Blood.* 2008 Jun 15;111(12):5601-9.
94. Toulza F, Heaps A, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR. High frequency of CD4⁺FoxP3⁺ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. *Blood.* 2008 May 15;111(10):5047-53.
95. Best I, Lopez G, Verdonck K, Gonzalez E, Tipismana M, Gotuzzo E, et al. IFN-gamma production in response to Tax 161-233, and frequency of CD4⁺ Foxp3⁺ and Lin⁺HLA-DR^{high}CD123⁺ cells, discriminate HAM/TSP patients from asymptomatic HTLV-1-carriers in a Peruvian population. *Immunology.* 2009 Sep;128(1 Suppl):e777-86.
96. Kansas GS, Wood GS, Tedder TF. Expression, distribution, and biochemistry of human CD39. Role in activation-associated homotypic adhesion of lymphocytes. *J Immunol.* 1991 Apr 1;146(7):2235-44.
97. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007 Aug 15;110(4):1225-32.
98. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med.* 2007 Jun 11;204(6):1257-65.
99. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, et al. CD39⁺Foxp3⁺ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2009 Dec 1;183(11):7602-10.
100. Vaknin-Dembinsky A, Balashov K, Weiner HL. IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol.* 2006 Jun 15;176(12):7768-74.
101. Goon PK, Igakura T, Hanon E, Mosley AJ, Barfield A, Barnard AL, et al. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD4⁺ T cells: immunodominance hierarchy and preferential infection with HTLV-I. *J Immunol.* 2004 Feb 1;172(3):1735-43.

-
102. Hollsberg P. Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999 Jun;63(2):308-33.
103. Inoue J, Seiki M, Taniguchi T, Tsuru S, Yoshida M. Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40x encoded by human T-cell leukemia virus type 1. *EMBO J.* 1986 Nov;5(11):2883-8.
104. Nagai M, Kubota R, Greten TF, Schneck JP, Leist TP, Jacobson S. Increased activated human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax11-19-specific memory and effector CD8+ cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV-I provirus load. *J Infect Dis.* 2001 Jan 15;183(2):197-205.
105. Poiesz BJ, Dube S, Choi D, Esteban E, Ferrer J, Leon-Ponte M, et al. Comparative performances of an HTLV-I/II EIA and other serologic and PCR assays on samples from persons at risk for HTLV-II infection. *Transfusion.* 2000 Aug;40(8):924-30.
106. Osame. Review of WHO Kagoshima Meeting and diagnostic guidelines for HAM/TSP In: Blattner W, editor. *Human Retrovirology: HTLV.* New York: Raven Press; 1990. p. 191-7.
107. Dwyer KM, Hanidziar D, Putheti P, Hill PA, Pommey S, McRae JL, et al. Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+ CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype. *Am J Transplant.* 2010 Nov;10(11):2410-20.
108. Dodon MD, Li Z, Hamaia S, Gazzolo L. Tax protein of human T-cell leukaemia virus type 1 induces interleukin 17 gene expression in T cells. *J Gen Virol.* 2004 Jul;85(Pt 7):1921-32.
109. Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, Asher TE, et al. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood.* 2008 Oct 1;112(7):2826-35.
110. Favre D, Mold J, Hunt PW, Kanwar B, Loke P, Seu L, et al. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci Transl Med.* 2010 May 19;2(32):32ra6.
111. Maloney EM, St Claire Morgan O, Widner B, Werner ER, Fuchs D. Central nervous system activation of the indoleamine-2,3-dioxygenase pathway in human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 2000 Jun;181(6):2037-40.
112. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005 Jan 17;201(2):233-40.
113. Harrington LE, Mangan PR, Weaver CT. Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol.* 2006 Jun;18(3):349-56.
114. Janeway CA, Jr., Carding S, Jones B, Murray J, Portoles P, Rasmussen R, et al. CD4+ T cells: specificity and function. *Immunol Rev.* 1988 Jan;101:39-80.
115. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
116. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003 Feb 13;421(6924):744-8.

-
117. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235-8.
 118. Gershon RK, Eardley DD, Durum S, Green DR, Shen FW, Yamauchi K, et al. Contr suppression. A novel immunoregulatory activity. *J Exp Med*. 1981 Jun 1;153(6):1533-46.
 119. Lehner T. Special regulatory T cell review: The resurgence of the concept of contr suppression in immunoregulation. *Immunology*. 2008 Jan;123(1):40-4.
 120. Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Sevigny J, Matsue H, Enjyoji K, et al. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med*. 2002 Apr;8(4):358-65.
 121. Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, et al. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol*. 1997 Aug 1;159(3):1451-8.
 122. Khakh BS, North RA. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature*. 2006 Aug 3;442(7102):527-32.
 123. la Sala A, Ferrari D, Corinti S, Cavani A, Di Virgilio F, Girolomoni G. Extracellular ATP induces a distorted maturation of dendritic cells and inhibits their capacity to initiate Th1 responses. *J Immunol*. 2001 Feb 1;166(3):1611-7.
 124. Bours MJ, Swennen EL, Di Virgilio F, Cronstein BN, Dagnelie PC. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther*. 2006 Nov;112(2):358-404.
 125. Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, et al. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol*. 1994 Oct 15;153(8):3574-83.
 126. Grinthal A, Guidotti G. CD39, NTPDase 1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why? *Purinergic Signal*. 2006 Jun;2(2):391-8.
 127. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330-6.
 128. Yamano Y, Nagai M, Brennan M, Mora CA, Soldan SS, Tomaru U, et al. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):88-94.
 129. Hofstetter H, Gold R, Hartung HP. Th17 Cells in MS and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Int MS J*. 2009 Apr;16(1):12-8.
 130. Milner JD, Brenchley JM, Laurence A, Freeman AF, Hill BJ, Elias KM, et al. Impaired T(H)17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. *Nature*. 2008 Apr 10;452(7188):773-6.
 131. Furuzawa-Carballeda J, Vargas-Rojas MI, Cabral AR. Autoimmune inflammation from the Th17 perspective. *Autoimmun Rev*. 2007 Jan;6(3):169-75.
 132. Hofstetter HH, Ibrahim SM, Koczan D, Kruse N, Weishaupt A, Toyka KV, et al. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol*. 2005 Oct;237(2):123-30.
 133. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 2007 Oct;13(10):1173-5.

-
134. Garlet GP, Giozza SP, Silveira EM, Claudino M, Santos SB, Avila-Campos MJ, et al. Association of human T lymphotropic virus 1 amplification of periodontitis severity with altered cytokine expression in response to a standard periodontopathogen infection. *Clin Infect Dis*. 2010 Feb 1;50(3):e11-8.
135. Yamano Y, Araya N, Sato T, Utsunomiya A, Azakami K, Hasegawa D, et al. Abnormally high levels of virus-infected IFN-gamma+ CCR4+ CD4+ CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PLoS One*. 2009;4(8):e6517.
136. Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 2004 Oct;4(10):762-74.
137. De Luca A, Montagnoli C, Zelante T, Bonifazi P, Bozza S, Moretti S, et al. Functional yet balanced reactivity to *Candida albicans* requires TRIF, MyD88, and IDO-dependent inhibition of Rorc. *J Immunol*. 2007 Nov 1;179(9):5999-6008.
138. Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1121-33.