Lucas Emmanuel da Silva Semeão

Funcionalidade das células *Natural Killer* T – NKT - na
fisiopatogenia da Mielopatia associada ao HTLV/ Paraparesia
Tropical Espástica (HAM/TSP)

São Paulo
2015

Lucas Emmanuel da Silva Semeão

Funcionalidade das células *Natural Killer* T – NKT - na
fisiopatogenia da Mielopatia associada ao HTLV/ Paraparesia
Tropical Espástica (HAM/TSP)

Dissertação de mestrado - versão corrigida - apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Pós-Graduação em Alergia e Imunopatologia.
Orientadora: Dra. Karina Inácio Ladislau de Carvalho
Salmazi.

São Paulo
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

© Reprodução autorizada pelo autor, **DESDE QUE CITADA A FONTE!**

Semeão, Lucas Emmanuel da Silva

Funcionalidade das células *Natural Killer* T – NKT – na fisiopatogenia da mielopatia associada ao HTLV/paraparesia tropical espástica (HAM/TSP) / Lucas Emmanuel da Silva Semeão. -- São Paulo, 2014.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientadora: Karina Inácio Ladislau de Carvalho Salmazi.

Descritores: 1.Vírus 1 linfotrópico T humano 2.Paraparesia espástica tropical 3.Imunologia 4.Células T matadoras naturais 5.Citometria de fluxo 6.Elispot

DEDICATÓRIA

“Dedico aos pacientes infectados com o vírus HTLV, e aos desenvolvedores de suas doenças associadas, em especial os portadores da HAM/TSP, esperando que - algum dia - melhores condições de saúde lhes sejam possíveis...”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à minha família, pelas oportunidades concedidas, por todo apoio, incentivo e direcionamento na construção desta jornada, em especial meus pais Zilma e Edi, e minha avó Luzia Miguel. Agradeço também a todos os docentes que desde a pré-escola me ensinaram e instruíram, e aos quais devo uma enorme parcela de minha formação educacional, profissional e pessoal; e à minha orientadora Dr^a Karina Salmazi, pelas inúmeras orientações profissionais e pessoais dadas no decorrer do curso, viabilizando a construção deste trabalho e a obtenção do título de mestre.

Aos Doutores Jorge Kalil, Luiz Vicente Rizzo, Esper Kallas e Anna Carla Goldberg por viabilizarem o bom funcionamento da pós-graduação, e por abrirem as portas de seus laboratórios de pesquisa para a realização do trabalho.

Agradeço também aos Laboratórios de pesquisa da Faculdade de Medicina da USP, LIM-60 (Laboratório de investigação médica 60), e também do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein (IIEP-HIAE), por permitirem a realização do trabalho.

Agradeço imensamente aos amigos pós-graduandos do Laboratório de investigação médica (LIM-60) - USP, em especial a Priscila Ramos Costa, Carla Crude, Dayane e Emanuela Avelar e aos amigos e companheiros Heliene Alvarenga, Marília Normanton e Andressa D. Borges, do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa – Albert Einstein, pelos inúmeros momentos de descontração e discussão científica construtiva que demasiadamente contribuíram para minha formação profissional. Aos amigos Márcio Marosti, Bianca Kiers, Caroline Cardoso, Kallyandra Padilha e Hadassa Campos Santos, pela amizade e por todo companheirismo no decorrer destes últimos (quase) sete anos.

À saudosa Dona Inês, por seu acolhimento e por tornar mais leve a convivência no laboratório, bem como por seu inestimável trabalho, colaborando com o bom funcionamento do laboratório; e aos inúmeros colegas de trabalho com os quais convivi nestes últimos anos, em especial Bianca Natali, Fernanda Romano Bruno e Nádila Milan, às quais agradeço pela amizade e apoio em questões técnicas quando foi necessário.

Ao grupo de pesquisa em Alergia do LIM-60 - coordenado pela Dr^a Cristina Kokron - em especial às alunas de pós-graduação Angélica Alcalá, Nathalia Barsotti, Maíra Pedreschi, pela ótima convivência e apoio, e também, aos técnicos Carla Alves, Ruth Bonadia e Carlos Palma pelo mesmo motivo.

Aos doutores Fábio Leal e Hugo Barbosa, pelas amostras concedidas que viabilizaram a realização deste trabalho; às secretárias da Pós-graduação Eleni Arruda, Andréa e Tânia por todo apoio e ótimo serviço prestados; e também à Zelinda Nakagawa e Gisele Fekete agradeço pelo enorme auxílio às questões éticas e burocráticas da pós-graduação.

Ao Sérgio Alves, Issler, Candida e Cristiane Bressani pelo apoio nas questões administrativas, bem como à Helena Tomyiama e sua equipe por garantirem o excelente funcionamento do LIM-60.

Agradeço também a CAPES e a FAPESP pelas bolsas de mestrado concedidas, bem como a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho!

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

APCs – Células apresentadoras de antígeno profissionais
 ATLL - Adult T cell Leukemia/Lymphoma
 BHE – Barreira Hemato Encefálica
 CAPPesq - Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
 CD1d – Espécie de MHC-não clássico
 CMSP - Células mononucleares do sangue periférico
 CPV - Carga proviral
 CTL – Controles não infectados
 DMSO - Dimetilsulfóxido
 DNA – Ácido desoxirribonucéico
 dsRNA – Duas fitas simples de RNA
 EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
 ELISPOT – Enzyme Linked ImmunoSpot
 FACS – Fluorescence activated cell sorting
 GLUT-1 – Receptor de Glicose
 HAM/TSP - mielopatia associada ao HTLV/paraparesia tropical espástica
 HCFMUSP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
 HTLV - Vírus Linfotrópico de Células T humanas
 IFN- γ – Interferon Gamma
 iGb3 - iso-globo-tri-hexosil-ceramida
 IIEP - Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein
 LIM-60 - Laboratório de Investigação Medica 60
 LTR – Long Terminal Repeat
 M - Molar
 MHC – Complexo de histocompatibilidade principal
 mL - Mililitro
 mM - MicroMolar
 NKT - Células T Natural Killer
 Nm – nanometro
 PBS – Tampão fosfato salino
 PBST – Tampão fosfato salino contend Tween 20
 PD-1 – Programmed cell Death Protein 1
 PFA - Paraformaldeído
 PMA – Phorbol-12-myristate-13-acetate
 R10 - Meio de cultura celular
 RNA – Ácido Ribonucléico
 SFB - Soro fetal bovino
 SNC – Sistema nervoso central
 STLV - Linfotrópico de células T símias
 TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
 TCR - receptor de células T
 α -GalCer - α -GalactosilCeramida

LISTA DE FIGURAS, TABELAS E FÓRMULAS

FIGURAS

Figura 1: Estrutura do HTLV	11
Figura 2: Fluxograma do processamento das amostras	23
Figura 3: Gráfico de citometria representativo da Estratégia de Análise utilizada para avaliação de células T e NKT derivadas de CMSP.....	27
Figura 4: Estratégia de Análise utilizada para avaliação da expressão de PD-1 em células T e NKT derivadas de CMSP.....	28
Figura 4: Estratégia de Análise utilizada para avaliação da expressão de PD-1 em células T e NKT derivadas de CMSP.....	29
Figura 5: Imagens representativas dos poços de ELISPOT.	30
Figura 6: Frequência de linfócitos T (CD3+) em células mononucleares do sangue periférico.	35
Figura 7: Frequência de linfócitos T (CD3+) expressando marcador PD-1 em células mononucleares do sangue periférico.	36
Figura 8: Frequência de células NKT na subpopulação de linfócitos T (CD3+)	38
Figura 9: Frequência de células NKT expressando PD1	38
Figura 10: Avaliação da indução de Granzima B por células NKT após estimulação com PMA/Ionomomicina.....	39
Figura 11: Avaliação da secreção de IFN- γ após estimulação com estímulo específico para células NKT α -GalactosilCeramida.	40
Figura 12: Avaliação da secreção de Granzima B após estimulação com estímulo específico para células NKT α -GalactosilCeramida.	41

TABELAS

Tabela 1 – Relação dos anticorpos monoclonais utilizados para a imunofenotipagem de células NKT – superfície e intracelular - acompanhados de seus respectivos fluorocromos, clones e marca	26
Tabela 2: Distribuição demográfica dos pacientes da nossa coorte	32
Tabela 3: a) Distribuição dos dados de Mediana (1º Quartil – 3º Quartil) de nossa coorte durante imunofenotipagem de superfície.....	33
b) Distribuição dos dados de Mediana (1º Quartil – 3º Quartil) de nossa coorte durante imunofenotipagem intracelular	34

FÓRMULAS

Formula 1: Cálculo da concentração celular	23
Fórmula 2: Cálculo para determinação da Carga Proviral	24

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
Vírus Linfotrópico de Células T Humanas (HTLV)	11
Estrutura	11
Origem e Disseminação Viral	12
Epidemiologia	12
Transmissão	13
Transmissão do HTLV entre indivíduos	13
Transmissão do HTLV entre células e Replicação viral	14
Doenças Associadas ao HTLV	15
HAM/TSP	15
Imunologia da HAM/TSP	16
Células T Natural Killer (NKT)	16
Frequência e Fenótipo de células NKT Em Humanos Saudáveis	17
Reconhecimento De Antígenos	18
Funcionalidade das células NKT	18
NKT e HTLV	19
JUSTIFICATIVA	20
OBJETIVOS	21
Objetivo específico	21
MÉTODOS	22
Coleta das amostras	22
Voluntários	22
Sangue periférico	22
Células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	23
Descongelamento de CMSP	24
Avaliação Imunofenotípica dos Leucócitos CD45, CD3, CD4 e CD8 (Multitest)	24
Determinação da Carga Proviral	24
Imunofenotipagem de Superfície Celular	24
Estimulação inespecífica e Imunofenotipagem Intracelular	25
Citometria de Fluxo	26
Aquisição e Análise por Citometria de Fluxo	26
Elispot	30
Armazenamento de dados e análise estatística	31
RESULTADOS	32
Dados Demográficos	32
Linfócitos T	35
Avaliação da Expressão de PD-1 nos Linfócitos T	36
Avaliação da frequência de Células NKT em células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	37
Avaliação da Expressão de PD-1 em células NKT (CD3+V α 24+V β 11+)	38
Avaliação da secreção de IFN- γ e Granzima B pelas células NKT	39
Avaliação da secreção de Interferon Gama (IFN γ) por Elispot	40
Avaliação da secreção de Granzima B (GB) por Elispot	41
DISCUSSÃO e CONCLUSÕES	42
ANEXOS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

A HAM/TSP é uma doença de caráter neurológico que acomete aproximadamente 5% dos infectados pelo vírus HTLV, afetando-os principalmente em sua capacidade locomotora. Não são conhecidos até o momento os fatores que fazem o indivíduo infectado desenvolver ou não as patologias associadas ao vírus. Nesse contexto, estudamos a participação das células *natural killer* T (NKT) visando contribuir na elucidação da patogênese da paraparesia espática tropical HAM/TSP. As células *natural killer* T (NKT) são um subtipo de linfócitos T, com capacidade efetora e auxiliar, e está associado à doenças infecciosas, alergias e a doenças autoimunes, e a hipótese deste trabalho é que elas participem da progressão da HAM/TSP. Após realizarmos testes para avaliação da ativação das NKT (PD-1), bem como avaliar sua capacidade de secretar IFN- γ e Granzima B concluímos que as mesmas não possuem potencial de ativação na periferia e pressupomos que estas podem estar no sítio acometido pela patologia, o SNC. Neste contexto, nosso estudo acrescenta informações quanto à patogenia da HAM/TSP e contribui com conhecimento para a futura elucidação da doença.

ABSTRACT

The HAM/TSP is a neurological disease that affects approximately 5% of HTLV infected individuals, especially in their locomotor capacity. They are not known yet the factors that make the infected individual to develop or not the pathologies associated with virus. In this context, we study the participation of *natural killer T cells* (NKT), trying to contribute to clarify the HAM/TSP pathogenesis. NKT cells are a subtype of lymphocytes with effector and helper capacities, and are associated with infectious, allergies and autoimmune diseases. Our hypothesis is that they participate in the progression of HAM/TSP. After evaluate the activation of NKT through PD-1 marker, as well evaluate assess their ability to secrete IFN- γ and Granzyme B, we conclude that the NKT cells lack periphery in activation potential, and presuppose that they are present at the central nervous system, the site affected by the disease. In this context, our study adds information on the pathogenesis of HAM / TSP and contributes knowledge for future elucidation of disease

INTRODUÇÃO

Vírus Linfotrópico de Células T Humanas (HTLV)

O Vírus Linfotrópico de Células T humanas (HTLV) é um patógeno pertencente à família dos retrovírus. Apresenta uma importante relevância clínica, devido ao seu mecanismo de transmissão, a evolução subclínica das infecções e sua associação com doenças graves. (1)

Existem, até o momento, quatro subtipos conhecidos de HTLV, dentre os quais os mais importantes nos quesitos patogenia e epidemiologia são o HTLV I e II. O HTLV-I é o mais estudado e conhecido e é sobre este que trataremos. Ele infecta vários tipos celulares como células endoteliais, (2) monócitos (2, 3) e linfócitos T, (4) sendo associado principalmente à patologias como a Malignidade de células T do adulto – que se manifesta como leucemia ou linfoma - e a Mielopatia associada ao HTLV/Paraparesia tropical espástica (HAM/TSP), sendo estas as patologias mais importantes causadas pelo vírus. (5)

Estrutura

O vírus mede aproximadamente 100nm de diâmetro. Este é composto por material genético viral envolto pelo capsídeo viral e pelo envelope. Envolvendo o capsídeo, há o envelope que contém proteínas virais. O material genético consiste em ácido ribonucleico de dupla fita (dsRNA), e este está presente no capsídeo juntamente às enzimas integrase, protease e transcriptase reversa (Fig. 1). (1)

Figura 1: Estrutura do HTLV

Fonte: Adaptado do website www.htlv.com.br

Foi descrito por Seiki (1983) e Shimotohno (1985) que o vírus possui em seu genoma as regiões gag, pol, env e pX. (6) O gene gag - codifica proteínas virais p19, p24 e p15; (7) o gene pol - codifica a transcriptase reversa, a RNase H e a integrase; o gene env - codifica as glicoproteínas gp45, gp20 e a proteína transmembrana; e o gene LTR que contém o gene X - atualmente chamado pX - que codifica Tax e Rex. (8)

Filogeneticamente, o vírus é subclassificado de acordo com a região em que é encontrado e com suas características genéticas. O subtipo A (Cosmopolita) é encontrado em várias regiões do mundo, sendo o predominante, e é também o subtipo mais encontrado nas regiões endêmicas - inclusive o Brasil. (9) Na região Centro-Africana os subtipos mais comuns são B, D, E, F, G, enquanto que na região Austrá-Melanésio o subtipo C prevalece. (10)

Origem e Disseminação Viral

Pouca informação se tem até o momento quanto à gênese viral, mas dados de estudos anteriores (5) sugerem que o HTLV tenha se originado em primatas (vírus símio - Simian T cell lymphotropic virus) e posteriormente transmitido aos humanos originando o que hoje conhecemos como vírus linfotrópico de células T humanas. Entretanto, apesar da teoria corrente, Miura e seus colaboradores (1994) demonstraram que a árvore filogenética do HTLV é muito divergente da encontrada no vírus símio, o que gera um aval desfavorável a esta teoria. (9)

Quanto ao local da gênese viral, acredita-se que o vírus tenha surgido na África e - partindo dela - tenha se disseminado por meio de fluxos migracionais, através dos quais o vírus teria atingido a Ásia, Europa e as Américas por meio do Estreito de Bering. (9, 11) A esta teoria dá-se o nome de migração trans-continental, e esta tem força à luz do trabalho de Li e colaboradores (1999) que encontraram sequências de DNA do HTLV (genes HTLV-1-pX e HTLV-1-LTR) em uma múmia que viveu a cerca de 1.500 anos no Chile (12) - período prévio à colonização Européia das Américas e ao tráfico negro.

Por fim, não menos importante, há de se considerar - historicamente - os grandes movimentos migracionais ocorridos durante a colonização das Américas pelos Europeus - incluindo o tráfico negro - que em muito colaboraram para a disseminação da infecção pelo HTLV nas Américas.

Epidemiologia

Não se conhece o número exato de infectados pelo HTLV no mundo, mas sabe-se que a infecção por HTLV é difusa e atinge grupos populacionais distintos em diferentes localidades.

As teorias de disseminação viral vêm de encontro - em muitos aspectos - ao perfil epidemiológico global atual. A África, tida como provável berço da infecção, apresenta-se hoje como uma das regiões de maior endemicidade para o HTLV, onde se reportam prevalências que variam entre 0,2 - 3% de indivíduos infectados na população. (10)

Pareado com a África, está o Japão que demonstra prevalência variável entre 0,5 – 6%, (10) embora não sejam conhecidos os mecanismos que geram esta elevada taxa de infecção no país.

Na América do Norte e Europa são observadas baixas prevalências da infecção, sendo nestas regiões a infecção praticamente restrita a grupos de usuários de drogas injetáveis e indígenas. (10)

A América do Sul representa uma grande área endêmica para a infecção pelo HTLV-1 e suas doenças associadas, sendo esta prevalência diretamente associada ao perfil populacional e às migrações ocorridas para a formação destas populações.

O Brasil é o país de maior prevalência, sendo o vírus encontrado em grandes quantidades nas regiões norte e nordeste, com destaque à região nordeste. (10) Salvador-BA na região nordeste – apresenta estimativa de 1,7% de infectados na população geral (13) sendo esta a cidade com mais alta prevalência do Nordeste e do Brasil. (10)

Estudos com doadores de sangue são os que fornecem representações mais aproximadas da prevalência da população geral. Na Bahia, a prevalência observada foi de 1,35% de infectados entre os doadores de sangue, apontando mais uma vez para a elevada frequência da infecção nesta região. Em outras regiões, a prevalência observada foi de 0,15% em São Paulo, 1,35% em Pernambuco e 0,78% de positividade no Rio de Janeiro. (14) Trabalhos brasileiros mostram ainda alta prevalência de HTLV entre indivíduos dos grupos de risco, onde foi observada prevalência de 4% entre homossexuais no Rio de Janeiro, e em paralelo, profissionais do sexo de Santos, Rio de Janeiro e Minas Gerais tiveram prevalências de 2,8%, 9% e 9% respectivamente. Outro grupo de risco presente no Brasil são os usuários de drogas injetáveis. Este grupo foi estudado no estado da Bahia onde foi reportada prevalência de 35,2% dentre os usuários. (14)

Por conta das prevalências da infecção no Brasil e de sua via de transmissão, a triagem em banco de sangue para o HTLV no país se tornou obrigatória em novembro de 1993, através da Portaria nº 1376 do Ministério da Saúde. (15)

Transmissão

A transmissão do HTLV ocorre basicamente em duas etapas que são: a transmissão viral de um indivíduo para outro, e o estabelecimento da infecção através da disseminação para novas células.

Transmissão do HTLV entre indivíduos

A transmissão do vírus ocorre por meio do contato do indivíduo com produtos de origem corporal contaminados, devendo-se ressaltar a necessidade de contato celular para que haja transmissão. (16)

A forma mais eficaz de transmissão do HTLV é através do contato com sangue contaminado, (5, 10) contabilizando de 15 a 60% das transmissões, (10) ocorrendo através do compartilhamento de perfuro-cortantes, bem como por hemotransfusões. (5)

Em seguida, tem-se a transmissão vertical como importante forma de transmissão. Tal via ocorre principalmente através da amamentação e é responsável por 20% das transmissões, (5) estando em maior risco de infecção os indivíduos amamentados por longos períodos. Há, também, de se levar em consideração, que as elevadas cargas provirais - do sangue e do leite materno - são agregadoras de risco para a transmissão por esta via. (5, 10)

Outra forma de transmissão é a sexual. Sendo mais eficaz na transmissão homem-mulher. Nesta via de transmissão, assim como em outros patógenos, a multiplicidade de parceiros é fator de risco importante para que ocorra a transmissão. Outra via de transmissão, menos comum no Brasil, é através do compartilhamento de perfuro-cortantes, que ocorre principalmente entre usuários de drogas. (5)

Transmissão do HTLV entre células e Replicação viral

A infecção celular pelo vírus HTLV ocorre em duas etapas, que são a entrada em uma nova célula, e a replicação viral. Durante o processo de entrada, é necessário que haja proximidade entre a célula infectada e a célula alvo, o que permite a passagem viral. Alguns mecanismos são conhecidos de transmissão intercelular do HTLV, dentre os quais temos a formação da sinapse virológica, a formação de conduítes celulares e a formação de biofilme. (16-18)

A sinapse virológica consiste em uma região de contato direto entre a célula infectada e a célula alvo. A sua formação é iniciada pela polarização dos microtúbulos da célula infectada em direção à nova célula guiando o encontro destas duas. Nesta interação, a molécula Tax é responsável por promover aumento na expressão de moléculas de adesão na célula infectada, facilitando a sua ligação à célula alvo. (16) Neste local, há acumulação de RNA viral e sua inserção na nova célula. (19)

Outra forma de transmissão do HTLV entre células é por meio da formação de prolongamentos de membrana chamados conduítes celulares, que prolongam o contato celular e facilitam a infecção. (18) Mais recentemente, foi descrita a presença de partículas virais infectantes na superfície da célula infectada. Estas, em associação a moléculas da matriz extracelular formam o chamado biofilme, também capaz de promover a infecção da célula alvo. (17)

Após o contato com a nova célula, o vírus penetra na membrana desta última utilizando-se de receptores nela presentes. Tais receptores são o GLUT-1 e a Neuropilina-1 que se ligam a proteína Env do HTLV e permitem a entrada na célula alvo. (20, 21)

Uma vez que a célula é infectada por alguma destas vias ocorre a replicação viral. Esta acontece principalmente através da divisão da célula infectada, (16, 22) embora o HTLV também possa se utilizar do aparato celular para a produção e liberação de partículas virais livres no plasma. (23)

Em ambas as formas de replicação, o vírus deve primeiramente promover sua integração ao genoma do hospedeiro, e esta ocorre por meio das enzimas virais. Na nova célula, o RNA viral é

reversamente transcrito em ácido desoxiribonucleico de dupla fita (dsDNA) pela transcriptase reversa, e integrado no DNA do hospedeiro pela integrase viral, e desta forma o HTLV passa à codificar suas proteínas e um novo vírus é formado. (24, 25)

Doenças Associadas ao HTLV

As patologias de maior relevância clínica resultantes da infecção por HTLV são a malignidade de células T que pode se manifestar como leucemia ou linfoma (Adult T cell Leukemia/Lymphoma – ATLL), e a paraparesia tropical espástica/mielopatia associada ao HTLV (HAM/TSP). (5)

Outras patologias também são associadas à infecção por HTLV como doenças do trato genito-urinário, (26, 27) dermatite infecciosa, (28) doenças articulares e do tecido conjuntivo, (29) bem como o agravamento da infecção pelo parasita *Strongyloides stercoralis*. (30, 31)

HAM/TSP

A mielopatia associada ao HTLV (HAM/TSP) é a manifestação clínica mais frequente do HTLV-1, sendo observada em cerca de 1-5% dos infectados. Esta doença se inicia gradualmente e tem curso lento, acometendo principalmente as mulheres infectadas pelo vírus. (32)

A HAM/TSP pode demorar de meses a décadas para se manifestar (32), geralmente se iniciando em média 18 anos após a infecção. Tais manifestações costumam ocorrer entre a terceira e quarta década de vida, (33) e indivíduos com idades elevadas tendem a ter progressão mais rápida da doença, (34) sendo que, trabalhos associam a elevada carga proviral ao desenvolvimento da doença, e esta é considerada por muitos como fator de risco para a HAM/TSP. (32, 35)

Os principais sintomas da doença são a paraparesia e a espasticidade, podendo-se observar ainda hiperreflexia e fraqueza progressiva em membros inferiores. (33) Em suas fases iniciais, o principal sintoma observado é o distúrbio de marcha que ocorre em aproximadamente 65% dos pacientes. Distúrbios sensitivos também são observados, tais como dormência, formigamento e dor nas regiões acometidas, (36) sendo comum o acometimento sensorial nas extremidades baixas; todavia a disfunção motora predomina em relação aos sintomas sensoriais. (33)

Distúrbios urinários são frequentes, ocorrendo em 33% dos pacientes, (34, 36) bem como infecções de repetição, litíase, bexiga hiperativa e disfunção erétil são comorbidades observadas nos portadores da patologia. (27, 37, 38)

A causa da HAM/TSP é atribuída a extensivas lesões progressivas no SNC acompanhadas de infiltrado inflamatório. As principais e mais severas lesões são vistas nas regiões medulares torácicas e lombares, embora possa haver lesões na região cervical e de tronco cerebral. (33)

O diagnóstico da HAM/TSP consiste na observação clínica dos sintomas acima, considerando diagnóstico diferencial para outras doenças de sintomatologia semelhante, dentre as quais deve se considerar as mielopatias e paraparesias de outras origens. Além dos parâmetros clínicos descritos acima, a HAM/TSP, apresenta certos parâmetros laboratoriais que complementam o diagnóstico. A

demonstração de pleocitose mononuclear discreta ocorre em alguns casos. Pode haver hiperproteínoorraquia, bandas oligoclonais de IgG e aumento da síntese intratecal de anticorpos específicos e podendo ser encontrados linfócitos com lobulações no sangue e no líquido. (36)

Imunologia da HAM/TSP

O desenvolvimento da HAM/TSP ainda é obscuro, mas é amplamente aceito que haja intensa participação da resposta imune celular antiviral na patogênese da HAM/TSP.

Observa-se uma intensa resposta imune na medula espinhal dos pacientes com HAM/TSP. As leptomeninges e vasos sanguíneos são infiltrados com linfócitos, e estes podem também penetrar no parênquima circundante, participando ativamente da patogênese da doença. (33)

Os linfócitos T CD8 podem agir como efetores contra as células infectadas, principalmente T CD4 que são alvos preferenciais do vírus, o que acarretaria na depleção das CD4 infectadas no curso da doença. (39) Desta forma, as células T CD8 teriam papel benéfico e protetor contra o desenvolvimento de doença. Por outro lado, pode ocorrer a ativação persistente e desregulada das células T CD8, o que leva ao comprometimento funcional destas células no curso da HAM/TSP, favorecendo a doença. (40, 41)

Por sua vez, células CD4 de pacientes infectados pelo HTLV tem elevada produção espontânea de IFN- γ , sendo esta acentuada nos indivíduos com HAM/TSP. (42) Esta produção pode ser relacionada à subpopulações específicas de células T CD4, como por exemplo as células CD4⁺ que expressam os marcadores CD39⁺CD25⁺, (43) e células CD4⁺CCR4⁺CD25⁺, (44) reportadas pelas suas elevadas produções de IFN- γ durante a HAM/TSP.

Apesar da produção de IFN- γ ser demasiadamente elevada, outras citocinas são acometidas na HAM/TSP. Trabalhos têm demonstrado que pouco é alterada a produção de IL-5 e IL-10 (45), embora outros mostram decréscimo na produção de IL-10 (44) e IL-17 (42-44) dados que em conjunto apoiam para um fenótipo voltado a Th1, e não Th17 como observado em outras doenças neurológicas como a esclerose múltipla.

Outra função celular alterada que se observa nos pacientes com HAM/TSP é a proliferação celular exacerbada, isso em comparação a indivíduos não infectados e infectados assintomáticos, (45) o que favorece o curso da infecção.

Células T Natural Killer (NKT)

Dentro do contexto da patogenia da HAM/TSP mediada por secreção maciça de citocinas, pode-se relacionar um subgrupo celular conhecido como células *T Natural Killer* ou *Natural Killer T*, cuja sigla é NKT.

As células NKT compartilham características de células NK e também de células T. As NKTs expressam a molécula de CD3 em sua superfície, (46) bem como o receptor de células T (TCR). O TCR das NKTs difere daquele observado em células T, pois apresenta poucas variações clonais.

Deste modo, as NKT humanas expressam um TCR invariante, contendo cadeias V α 24J α Q e repertório V β limitado, sendo a grande maioria V β 11. (47-51) Da mesma forma ocorre em murinos, onde se encontra o TCR de cadeia V α 14-J α 18. (49, 52)

As NKT também podem expressar as moléculas CD4 e CD8, e sabe-se que uma grande fração das células NKT V α 24 são CD4⁺. (53) As demais subpopulações de NKT expressam em suas superfícies as combinações possíveis das moléculas CD4 e CD8, sendo então observadas as subpopulações CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻. (51, 54, 55)

Estas células expressam ainda uma molécula típica de células NK, que é o CD161 ou NKR-P1A, considerado um marcador de maturação em células NKT humanas e o mais tradicional marcador de NK expresso em NKT. (47, 56, 57) Mais recentemente, tem sido demonstrado que estas células expressam em sua superfície outras moléculas, como por exemplo, o CD45RA, (51, 55) CD7, (51) CD56, (55) NKG2D, (58) CD25, CD27, CD28, (51) CCR7, (51, 55) CCR4, CXCR4 e CCR1. (59)

Frequência e Fenótipo de células NKT Em Humanos Saudáveis

A frequência destas células em humanos é pequena e varia entre os diferentes tecidos. A sua frequência está entre 0,01 – 1% das células CD3⁺ do sangue periférico, (59) 0,08% no baço e 0,06% no cordão umbilical 0,007 no timo. (55)

O fenótipo das NKTs varia de acordo com o sítio anatômico, tendo sido reportado que no timo e cordão umbilical predominam células CD4⁺ (>90%), enquanto que no sangue periférico e baço havia proporções semelhantes entre células CD4⁺ e CD4⁻. (55) O perfil fenotípico das NKTs também pode variar de acordo com o gênero do indivíduo, pois sabe-se que homens possuem maior tendência a terem células NKT com fenótipo CD4⁺, enquanto que mulheres têm distribuição pareada. (51, 60) É conhecido também que sujeitos com frequência de NKT maior que 0,1% dos linfócitos apresentam maior quantidade de NKT CD4⁻ e sugere-se que a expansão leve a predomínio deste fenótipo. (51)

Sabe-se ainda que maiores frequências de NKTs – de ambos fenótipos - no sangue periférico de indivíduos do gênero feminino. Foram reportadas, em caucasianos, frequências de 0,07% em mulheres enquanto que homens apresentavam frequência de 0,04%. (51) Em asiáticos a mesma situação ocorre, pois foi observada mediana de NKT de 0,14% (0,02-0,63%) em mulheres e 0,09% (0,01-0,58%) em homens. (60) Tais diferenças são acentuadas com o avançar da idade, sendo que homens com mais de 61 anos têm queda considerável na frequência de NKT, enquanto que a frequência pouco decai nas mulheres. (60)

Reconhecimento De Antígenos

A molécula de CD1d (MHC-não clássico) pertence a uma família genes humanos não polimórficos composta por cinco genes CD1a, CD1b, CD1c, CD1d e CD1e, que semelhantemente às moléculas de MHC medeiam a apresentação de lipídios antigênicos na superfície das APCs. (61) Esta molécula é responsável pela apresentação de antígenos para as células NKT, (46, 52, 62) sendo que estas células são especializadas no reconhecimento de antígenos glicolipídicos apresentados via CD1d. (63) Tanto glicolipídios próprios como não-próprios são passíveis de serem reconhecidos pelas células NKT. Dentre os próprios, podemos citar o autoantígeno iso-globo-tri-hexosil-ceramida (iGb3), (64) e dentre os não-próprios, temos a α -GalactosilCeramida (α -GalCer). A α -GalactosilCeramida (α -GalCer) é um composto derivado da esponja-do-mar *Agelas mauritanus* (46) capaz de se ligar eficazmente à molécula de CD1d. Esta ligação origina um complexo capaz de se ligar ao TCR das NKTs, culminando na ativação destas células. (56, 61, 63) Devido à sua atividade como potente ativador de NKTs, a α -GalCer vem sendo utilizada em vários modelos de estudo destas células, onde tal molécula lhes serve como estímulo específico. (58, 65)

Em estudos *in vitro* a α -GalCer é utilizada para induzir a produção e secreção de citocinas, bem como a expansão destas células. (48)

Para tal finalidade, existem muitas formas de utilização da α -GalCer, como por exemplo, por meio de linhagem celular P815 expressando artificialmente o complexo CD1d- α -GalCer, (58) ou ainda por meio de proteína de fusão Fc-protein ligada ao CD1d (hCD1d-Fc) expressando α -GalCer. (66)

Além da α -GalCer, outros glicolipídios já foram também reportados como capazes de promover ativação considerável das células NKTs, e cada um destes desencadeia um tipo de resposta nessa subpopulação celular. Neste grupo podemos listar aqueles encontrados na parede celular de Sphingomonas, (64) o Manosídeo fosfatidil inositol (PIM), presente na parede celular micobacteriana, (67) e o lipídeo endógeno β -D-glucopyranosylceramide (β -GlcCer) encontrado em órgãos linfóides. (52)

Funcionalidade das células NKT

As células NKT são conhecidas por sua capacidade funcional. Estas podem promover secreção de citocinas de perfil Th1 (46, 51), Th2, (46, 51, 68) bem como citotoxicidade (48, 66) de acordo com o estímulo que recebem.

Expressam ainda em sua superfície as moléculas de CD4 e CD8 que são associadas às suas diferentes funcionalidades. A molécula de CD4⁺, quando expressa em NKTs, é conhecida por estar associada à produção de citocinas dos diferentes perfis, (51, 59) tanto Th1 como Th2. (66) Por outro lado, quando a NKT expressa o CD8 em sua superfície, esta célula é associada à função citotóxica e à produção de citocinas quase exclusivamente de perfil Th1. O mesmo é válido para as NKT que não expressam ambas as moléculas. (48, 51, 58, 59, 66)

Observa-se, ainda, que a expressão do marcador CD161 também pode ser um preditor da capacidade funcional das NKTs. Sabe-se que as NKTs CD161⁺ tendem a ter maior produção de TNF- α e IFN- γ após estimulação inespecífica, (55) sugerindo que a maturação funcional seja necessária para melhor secreção de citocinas.

As NKT CD4⁻ também são capazes de promover citotoxicidade, provavelmente através do reconhecimento do CD1d na célula alvo. (66) Acredita-se que, inicialmente, o CD1d seja necessário para promover a interação primária entre célula alvo e NKT, uma vez que células CD1d-negativas não são lisadas. (48, 66) Todavia, o CD1d em baixa expressão na célula alvo desencadeia a resposta citotóxica das NKTs, (58) demonstrando que a presença deste é necessária para ativar esta função celular.

Outra molécula que participa do processo de citotoxicidade em células NKT é o NKG2D. Esta molécula é um receptor ativador presente em NKs e NKTs que reconhece moléculas semelhantes ao MHC (MHC-like), expressas por células infectadas por vírus ou células tumorais (31). Sabe-se atualmente que esta molécula, quando ativada, induz a polarização de grânulos citotóxicos de células NKTs para a região celular onde ocorre a sua expressão. Isto ocorre tanto em células frescas, como em expandidas, sugerindo que esta molécula seja um coestimulador necessário na resposta citotóxica a NKT contra lipídeos antigênicos. (58)

Embora as NKTs tenham importantes capacidades efectoras, elas se encontram em baixas frequências no sangue periférico, e este é um desafio para o estudo desta população celular. A fim de contornar este obstáculo, tem-se utilizado o protocolo de expansão *in vitro* de NKT, que geralmente é realizada através do uso de IL-2 e α -GalCer. (48, 50)

NKT e HTLV

Até o momento, apenas dois trabalhos foram publicados sobre a participação das células NKTs na patogênese da HAM/TSP.

Nosso grupo publicou um estudo no qual observaram-se diferenças nas frequências e fenótipos das células NKTs nos portadores de HAM/TSP. Foi demonstrado que, na HAM/TSP, a frequência de NKT era significativamente baixa, quando comparada aos portadores assintomáticos do HTLV-1. Observou-se também que no sangue periférico a frequência do subtipo CD4⁺ de NKT era maior, quando comparadas com o subtipo CD8⁺ NKT nestes mesmos pacientes. (69)

Outro estudo mostrou ainda a reduzida frequência de células NKTs nos pacientes infectados, sendo esta acentuada na HAM/TSP. Observaram também no grupo total de infectados depleção preferencial das NKT CD4⁻. Neste estudo, a frequência de células NKTs foi inversamente e significativamente correlacionada à carga proviral, mostrando que quanto menor a frequência de células NKT, maior a carga proviral. (50)

Observando-se então a possível infecção destas células, demonstrou-se que sim, estas são passíveis de serem infectadas. Nestas há a presença de carga proviral média de 20,6 cópias/1000

CMSP (Células mononucleares do sangue periférico), embora estas células não sejam alvo preferencial do vírus.

Com base nos conhecimentos prévios a respeito da resposta das células T e sua elevada produção de IFN- γ na patogênese da HAM, e com base nas informações a respeito da função citotóxica das células NKT, hipotetizamos que as células NKT participem ativamente na patogênese da doença por meio da produção de citocinas (IFN- γ) e por meio de citotoxicidade.

Sendo assim, é necessário investigarmos o perfil funcional destas células nos portadores de HTLV desenvolvedores de HAM/TSP e assintomáticos.

JUSTIFICATIVA

As células *natural killer T* (NKT) são capazes de estabelecer uma interação entre a imunidade inata e adaptativa. Tem a capacidade de secretar altos níveis de citocinas em um curto período de tempo. O estudo destas células é de fundamental importância para o entendimento do sistema imunológico, bem como para melhor compreensão das principais patologias que acometem os seres humanos, ou seja, as doenças infecciosas, as neoplasias e as doenças autoimunes. O HTLV é um modelo muito interessante para o estudo das células NKTs. Uma doença infecciosa crônica com apresentações clínicas diversas. Alguns pacientes evoluem com neoplasias (ATLL), outros com doença neuroinflamatória (HAM/TSP), outros com doenças autoimunes ou imunossupressão que favorecem o surgimento de algumas coinfeções.

Em estudo realizado pelo nosso grupo em 2009 observamos que as células NKT, têm frequência reduzida na periferia em pacientes HAM/TSP, quando comparados com controles não infectados e pacientes assintomáticos. Algumas teorias foram pontuadas neste estudo. A primeira delas é o fato de que as células NKT podem ter migrado para o sítio inflamatório. A outra teoria, é que como observamos que as células NKT CD4⁺ estão presentes em maior quantidade nos pacientes HAM/TSP, estas podem secretar altos níveis de IFN- γ , favorecendo a progressão da doença. Para confirmarmos estas teorias, decidimos realizar estudos funcionais e utilizar marcadores de migração em pacientes assintomáticos, com HAM/TSP e indivíduos saudáveis para compreendermos melhor a patogênese desta doença.

OBJETIVOS

O objetivo deste projeto de pesquisa é estudar a interação funcional das células NKT na patogênese da HAM/TSP, visando esclarecer sua participação na fisiopatogenia e progressão da doença.

Objetivo específico

- Definir o padrão de citocinas secretadas pelas células NKT e correlacionar com aspectos clínicos da doença HAM/TSP.
- Verificar se as células NKT têm perfil citolítico na doença HAM/TSP.

MÉTODOS

Coleta das amostras

Para a realização deste estudo, utilizamos amostras de Células mononucleares do sangue periférico (CMSP).

A coleta das amostras de sangue foi realizada por punção venosa periférica de pacientes que participaram voluntariamente do estudo, sendo a amostra condicionada em tubos com EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético). Tais amostras já se encontravam processadas pela técnica de separação de CMSP e criopreservadas, estando prontas para uso. As amostras de CMSP utilizadas neste estudo foram cedidas pelo Dr. Esper Georges Kallas e são provenientes de seu estudo com o Dr. Fábio Eudes Leal (Aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq sob o número de protocolo 0855/08).

O estudo atual “Funcionalidade das Células T *Natural Killer* – NKT na fisiopatogenia da Mielopatia associada ao HTLV/ Paraparesia Tropical Espástica (HAM/TSP)”, foi aprovado pelo comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HCFMUSP) sob o parecer nº 368.027/2013.

Voluntários

Os pacientes estudados foram recrutados anteriormente pelo Prof. Dr. Esper Kallas para o desenvolvimento de sua pesquisa, tendo os pacientes concordado livremente em participar, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Aprovado na CAPPesq sob protocolo 0855/08).

Os voluntários não infectados – chamados de controles - foram recrutados no Laboratório de Investigação Médica 60 (LIM – 60) e assinaram TCLE (Aprovado pelo comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP - HCFMUSP - sob o parecer nº 368.027/2013).

Temos no estudo os grupos descritos abaixo:

Grupo 1: Pacientes infectados pelo HTLV assintomáticos (n=42);

Grupo 2: Pacientes infectados pelo HTLV portadores de mielopatia associada ao HTLV (HAM/TSP) (n=15);

Grupo 3: Voluntários saudáveis não infectados, que neste trabalho chamaremos de controles (CTL) (n=19);

Sangue periférico

Realizada a flebotomia, todas as amostras de sangue periférico foram processadas em cabine de fluxo laminar previamente esterilizada com Álcool 70% e Luz Ultravioleta durante 15 minutos. O processamento das amostras seguiu o fluxograma a seguir:

Figura 2: Fluxograma do processamento das amostras

Células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

A separação das células mononucleares do sangue periférico foi realizada através de centrifugação da amostra com gradiente de densidade Ficoll-Paque™ (GE Healthcare). Em seguida as células foram acondicionadas em meio de cultura R10 [500mL de meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO™), 50mL de soro fetal bovino - SFB (GIBCO™) previamente inativado pelo calor, 5mL de solução tampão Hepes 1M (GIBCO™), 5mL L-Glutamina – 200mM (GIBCO™), Solução piruvato 100mM (GIBCO™), 5mL de Penicilina (GIBCO™), 5mL de Estreptomicina (GIBCO™) e 0,5mL de 2-mercaptoetanol (GIBCO™)].

A contagem celular foi realizada utilizando o corante azul de trypan (Trypan Blue). Em seguida foi feita diluição e correção da concentração celular através da contagem na câmara de Neubauer. Os cálculos foram realizados com a seguinte fórmula:

Formula 1: Cálculo da concentração celular

$$\text{Concentração celular} = \text{N}^\circ \text{ médio de células contadas na câmara} \times \text{Valor da diluição} \times 10.000$$

*Obs: 10.000 corresponde ao valor de correção da câmara de Neubauer

Após os cálculos, as células foram criopreservadas em meio de congelamento [Dimetilsulfóxido -DMSO- (SIGMA®) + 10 % de Soro Fetal Bovino (GIBCO™)]. As células foram transferidas para criotubos na concentração de 1×10^7 células/mL, permanecendo no freezer -80°C durante 24 horas e foram, em seguida, transferidas para o tanque de nitrogênio líquido.

Descongelamento de CMSP

O criotubo foi retirado do tanque de nitrogênio líquido e transportado em gelo seco até o banho-maria (37°C) no qual foi parcialmente descongelado até o desprendimento da amostra da parede do tubo, mantendo ainda a presença de gelo. Em seguida, seu conteúdo transferido para tubo cônico contendo 8 mL meio R10. Este foi centrifugado e as células contadas para avaliação do número por meio do Tripan Blue. Os cálculos utilizados são os mesmos descritos no protocolo de separação de CMSP.

Avaliação Imunofenotípica dos Leucócitos CD45, CD3, CD4 e CD8

(Multitest)

Logo após a coleta do sangue periférico, uma alíquota de 100µL do sangue total foi separada. Nesta, foram adicionados 20µL de anticorpo MultiTest (BD Biosciences®), que contém os anticorpos com especificidade para CD45 (PerCP – Clone SK3), CD3 (FITC – Clone SK7), CD4 (APC – Clone 2D1) e CD8 (Pe – Clone SK1), cujos fluorocromos foram discriminados na sequência. Incubou-se a amostra por 15 minutos com o anticorpo, as hemácias foram lisadas usando BD FACS Lysing (BD Biosciences®), lavadas em solução tampão MACS Buffer e fixadas com Paraformaldeído 1% (SIGMA®) para posterior análise por citometria de fluxo.

Determinação da Carga Proviral

A Carga proviral (CPV) foi determinada de acordo com Leal (2013). Esta foi avaliada por meio de kit comercial Qyagen GmbH seguindo as instruções do fabricante, e com primers previamente descritos específicos para amplificar fragmento de 158pb da região Tax do genoma viral. As amostras utilizadas foram CMSPs. (43)

Cada amostra foi analisada em duplicata e a média dos 2 valores emituiu o resultado. Os primers do gene da β Globina foram usados como controle interno. O Cálculo determinou a CPV a cada 1000 células analisadas. O cálculo realizado foi o seguinte:

Fórmula 2: Cálculo para determinação da Carga Proviral

$$\text{CPV em CMSP} = \frac{(\text{Número de cópias de HTLV-1 de Tax})}{(\text{Número de cópias da Globina Beta-2}) \times 1000 \text{ células}}$$

Imunofenotipagem de Superfície Celular

Para a imunofenotipagem de células NKT, realizamos marcação de superfície celular com anticorpos monoclonais e posterior análise por citometria de fluxo.

As CMSP previamente descongeladas foram transferidas para placa de 96 poços fundo V (NUNC™ Brand Products). Subsequentemente foram realizadas duas lavagens com solução tampão

FACS Buffer (170 μ L), [composto por 0,5000g de azida sódica (SIGMA[®]) diluída em 500mL de PBS 1x (GIBCO[™]) - tampão fosfato/salina (GIBCO[™]), previamente preparado por diluição em água destilada, e 10mL de SFB].

Após as lavagens, foram adicionados os anticorpos monoclonais de superfície: CD19 & CD14 (marcadores de exclusão), Live & Dead (marcador de viabilidade) CD3, V α 24, V β 11 (marcadores de caracterização de NKT), CD4, CD8, PD-1. Em seguida, foi feita incubação de 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro.

Os anticorpos monoclonais utilizados para a imunofenotipagem de células NKT encontram-se discriminados na tabela 1.

Depois de marcadas, as células foram fixadas com Paraformaldeído 1% (SIGMA[®]) e armazenadas em refrigerador durante período máximo de 7 dias até a aquisição no citômetro de Fluxo, como descrevemos no item 6.1.

Estimulação inespecífica e Imunofenotipagem Intracelular

Para avaliar a secreção de IFN- γ e Granzima B pelas células NKT, estas células foram estimuladas com PMA/Ionomicina.

Subsequentemente ao descongelamento das amostras, as células foram contadas e plaqueadas em placa de fundo U, sendo adicionadas de 1×10^6 – 5×10^6 células em cada poço. As células foram então estimuladas com Forbol 12-miristato-13-acetato conhecido como PMA (1mg/mL) em conjunto com Ionomicina (500ng/mL), sendo a placa subsequentemente encaminhada para a estufa (37° - 5% de CO₂), onde permaneceu por 2 horas. Adicionado Golgi Plug 5ug/mL (BD Biosciences[®]), sendo a placa devolvida para a estufa onde permaneceu por mais 6 horas.

Para a imunofenotipagem intracelular, utilizamos os marcadores de superfície: CD19 & CD14 (marcadores de exclusão), CD3, V α 24, V β 11 (marcadores de caracterização de NKT), CD4 e CD8, (marcadores das subpopulações de NKT). Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas com kit comercial da Invitrogen[™] (conforme instruções do fabricante) para a imunofenotipagem intracelular, na qual avaliamos a produção de IFN- γ e também Granzima B.

Tabela 1 – Relação dos anticorpos monoclonais utilizados para a imunofenotipagem de células NKT – superfície e intracelular - acompanhados de seus respectivos fluorocromos, clones e marca

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Marca
●○V α 24	Pe	C15	Beckman Coulter* [©]
●○V β 11	FITC	C21	Beckman Coulter* [©]
●CD3	PerCP	SK7	BD Biosciences* [©]
○CD3	PeCF594	UCTH1	BD Biosciences* [©]
●○CD4	PacBlue TM	RPAT4	BD Biosciences* [©]
●CD8	PeCy7 TM	SK1	BD Biosciences* [©]
○CD8	AmCyan	SK1	BD Biosciences* [©]
●○CD14	APC-Cy7 TM	M ϕ P9	BD Biosciences* [©]
●○CD19	APC-Cy7 TM	SCJ25C1	BD Biosciences* [©]
●PD-1	APC	MIH4	BD Pharmingen TM
●Live/Dead	AmCyan	—	Invitrogen* TM
○IFN- γ	PeCy7	B27	BD Biosciences* [©]
○Granzima B	Alexa700	GB11	BD Biosciences* [©]

BD Biosciences* - San Diego, CA, EUA

Beckman Coulter* – Immunotech, Marselha, França Invitrogen* - Carlsbad, CA, EUA

● Anticorpo utilizado na imunofenotipagem de Superfície

○ Anticorpo utilizado na imunofenotipagem Intracelular

Citometria de Fluxo

Aquisição e Análise por Citometria de Fluxo

As aquisições foram realizadas no citômetro FACS LSR Fortessa do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein (IIEP).

Como controles de qualidade do equipamento, utilizamos o CST (BD Cytometer setup and tracking beads – BD Biosciences[©]). As sobreposições de cores dos fluorocromos foram evitadas através do ajuste de voltagens utilizando Beads magnéticas (BD Biosciences[©]) previamente marcadas com fluorocromos individuais.

Foi adquirido um número de aproximadamente 1.000.000 de eventos em cada amostra, conforme a disponibilidade celular de cada uma. A aquisição foi realizada no programa DIVA (BD Biosciences[©]), os dados da citometria foram exportados no formato FCS 3.0 e analisados no software Flow Jo Versão X e versão 9.4.3 (TreeStar).

A estratégia de análise utilizada encontra-se ilustrada nas figuras 3, 4-a, 4-b e 5.

Estratégia de Análise em Citometria de Fluxo

Figura 3: Gráfico de citometria representativo da Estratégia de Análise utilizada para avaliação de células T e NKT derivadas de CMSP. A partir de uma Janela inicial, separamos por tamanho e granularidade as células com a morfologia de interesse (FSC x SSC) e destas excluimos as células mortas (Viabilidade). Excluimos também células positivas para os marcadores CD14+, CD19+ e, em paralelo, selecionamos as células positivas para o marcador CD3. No gate de células CD3+, avaliamos a expressão de CD4 e CD8, caracterizando os linfócitos T CD4 e T CD8 respectivamente. Ainda no gate de CD3+, selecionamos as células duplo-positivas para os marcadores V α 24 e V β 11, caracterizando as células NKT. Por fim analisamos a expressão das moléculas CD4, CD8 nas NKTs.

Figura 4: Estratégia de Análise utilizada para avaliação da expressão de PD-1 em células T e NKT derivadas de CMSP. (A) A partir do gate de linfócitos T CD4 (CD3+CD4+) e T CD8 (CD3+CD8+), avaliou-se a expressão de PD-1.

Figura 4: Estratégia de Análise utilizada para avaliação da expressão de PD-1 em células T e NKT derivadas de CMSP. (B) A partir do gate de células NKT (Va24+Vβ11+) positivas para CD4 e CD8, avaliou-se a expressão de PD-1.

Elispot

Das amostras descongeladas, separamos uma alíquota contendo 3×10^5 células para a avaliação da produção da citocina IFN- γ e de Granzima B (GB) por meio da metodologia de ELISPOT.

Para determinar a secreção de IFN- γ pelas células, placas de ELISPOT (Millipore, Billerica, MA) previamente umedecidas com PBS 1x (GIBCO™) foram revestidas com anti-IFN- γ ou anti-Granzima B (MABTECH®) na concentração de 10mg/mL.

Após lavar a placa com PBS, foi adicionado meio de cultivo R10 para bloquear ligações inespecíficas e subsequentemente, foram adicionadas as CMSP (3×10^5 células/poço) em meio R10 juntamente aos seus respectivos estímulos, que foram PMA (100ng/mL) e Ionomicina (500ng/mL) ou α -GalCer (0,2mg/mL) no volume final de 200 μ L. Como controle negativo foi realizada, em paralelo, avaliação da secreção basal dos analitos sem estímulo.

As placas foram encaminhadas à estufa (37°C em 5% de CO₂ por 16-20h). Ao final da cultura, foram lavadas uma vez com PBS e duas vezes com PBS-T [PBS 1x (GIBCO™)+Tween 20 (Fisher Scientific™)] e anticorpos de detecção Biotinilado (MABTECH®) anti-IFN- γ e anti-GranzimaB (1mg/mL) foram adicionados nos poços apropriados, incubando por 30 minutos a temperatura ambiente.

Novamente, as placas foram lavadas por duas vezes com PBST e adicionaram fosfatase alcalina conjugada a estreptavidina (JACKSON IMMUNORESEARCH LAB™), incubando por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada duas vezes com PBST e imersa em PBST durante uma hora. Subsequentemente foi adicionado o substrato azul (Vector Labs, # SK-5300; Burlingame, CA) durante 15 minutos e depois lavada com água de torneira. Após a secagem da placa, a contagem dos spots foi realizada por leitor automatizado AID ELISPOT. (Autoimmunb Diagnostika GMHB)

Figura 5: Imagens representativas dos poços de ELISPOT. As figuras da direita para a esquerda demonstram poço de ELISPOT sem estimulação, com estimulação por PMA/Ionomicina e com estimulação por α -GalCer, que estimula especificamente células NKT.

Armazenamento de dados e análise estatística

Para realizar a análise dos dados gerados através da técnica de citometria de fluxo foi utilizado o programa *Flowjo (Tree Star, Inc.)* versões 9.6.4.

Para análises estatísticas foi usado o Software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. Os testes utilizados foram: *Kruskal-Wallis* não paramétrico com comparação intergrupo pelo teste *Dunnet*. Os resultados descritos serão expressos em mediana (M) e interquartis (IQR 25%-75%) (M: IQR). Os valores de *p* considerados significantes foram menores que 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Dados Demográficos

Foram incluídos no estudo, doadores não infectados pelo HTLV (CTL), doadores infectados com sintomas (HAM/TSP) e os bem como doadores infectados Assintomáticos. Dos grupos deste projeto, 60% dos indivíduos eram do sexo feminino, conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2: Distribuição demográfica dos pacientes da nossa coorte

Característica dos pacientes			
Grupo	Amostras (n)	Gênero (feminino; masculino)	Idade: mediana (IQR ¹ ¼, ¾)
Controles	19	12; 7	32 (27; 38)
Assintomáticos	42	26; 16	44.5 (36.2; 52.2)
HAM/TSP ²	15	10; 5	46 (34.5; 57.5)

¹ Range interquartil. ² HAM/TSP

Tabela 3: a) Distribuição dos dados de Mediana (1º Quartil – 3º Quartil) de nossa coorte durante imunofenotipagem de superfície.

IMUNOFENOTIPAGEM DE SUPERFÍCIE														
CONTROLES														
TABELA	CD3	CD4	CD8	CD3 PD1	CD4 PD1	CD8 PD1	NKT	NKT CD4	NKT CD8	NKT CD4+CD8+	NKT CD4-CD8-	NKT PD1	NKT CD4 PD1	NKT CD8 PD1
1º Quartil	57,7	59,1	14,6	7,07	6,63	9,97	0	16,75	6,46	0,43	25,4	18,7	12,5	8,59
Mediana	80,5	66,6	27	8,95	9,49	15,75	0,1	31,9	15	1,02	47,3	23	26,3	19,4
3º Quartil	84,8	73,6	30,1	12,78	21,03	25,63	0,1	61,55	21,58	2,21	60,6	34,9	36,4	42,6
ASSINTOMÁTICOS														
TABELA	CD3	CD4	CD8	CD3 PD1	CD4 PD1	CD8 PD1	NKT	NKT CD4	NKT CD8	NKT CD4+CD8+	NKT CD4-CD8-	NKT PD1	NKT CD4 PD1	NKT CD8 PD1
1º Quartil	67,5	60,2	20,1	7,66	6,39	9,56	0	23,73	9,39	0	3,67	15,98	25,9	22,3
Mediana	76,4	67,7	27,4	13,6	11,25	14	0,1	42	14,25	0,86	21,7	25,55	33,8	31,5
3º Quartil	86,7	75,6	34,1	17,13	17,38	20,8	0,3	63,63	20,68	1,98	44,85	40,2	42,4	49,5
HAM/TSP														
TABELA	CD3	CD4	CD8	CD3 PD1	CD4 PD1	CD8 PD1	NKT	NKT CD4	NKT CD8	NKT CD4+CD8+	NKT CD4-CD8-	NKT PD1	NKT CD4 PD1	NKT CD8 PD1
1º Quartil	22,5	64,2	10,2	7,16	6,87	9,04	0	28,08	3,33	1,25	17,5	20,2	11,6	21,93
Mediana	38,4	77,3	16,3	11,3	9,27	13,8	0	50,3	11,9	2,77	37,65	24,3	18,05	29,65
3º Quartil	81,1	84,8	30,5	15,6	15,15	17,1	0,1	66,7	21,2	3,78	50,85	33,55	31,85	35,13

Tabela 3: b) Distribuição dos dados de Mediana (1º Quartil – 3º Quartil) de nossa coorte durante imunofenotipagem intracelular

IMUNOFENOTIPAGEM INTRACELULAR								
CONTROLES								
TABELA	CD3	CD3 IFN γ (PMA/IONO)	CD3 IFN γ (aGalCer)	NKT	NKT Granzima B (PMA/IONO)	NKT Granzima B (aGalCer)	NKT IFN γ (PMA/IONO)	NKT IFN γ (aGalCer)
1º Quartil	3,39	1,09	0,08	0,06	1,43	2,8	1,51	0
Mediana	5,01	2,64	0,13	0,12	3,77	6,63	8,89	0
3º Quartil	10,6	5,88	0,62	0,37	15,4	12,7	39,45	4,55
ASSINTOMÁTICOS								
TABELA	CD3	CD3 IFN γ (PMA/IONO)	CD3 IFN γ (aGalCer)	NKT	NKT Granzima B (PMA/IONO)	NKT Granzima B (aGalCer)	NKT IFN γ (PMA/IONO)	NKT IFN γ (aGalCer)
1º Quartil	3,58	0,19	0,03	0,01	4,01	0	1,43	0
Mediana	8,23	0,87	0,06	0,04	12,5	4,45	11,8	1,43
3º Quartil	15,3	3,34	0,11	0,19	18,6	11,4	26,95	2,41
HAM/TSP								
TABELA	CD3	CD3 IFN γ (PMA/IONO)	CD3 IFN γ (aGalCer)	NKT	NKT Granzima B (PMA/IONO)	NKT Granzima B (aGalCer)	NKT IFN γ (PMA/IONO)	NKT IFN γ (aGalCer)
1º Quartil	4,75	0,76	0,05	0,01	1,3	0	16,35	0
Mediana	7,15	5,39	0,08	0,04	15,6	2,24	21,3	3,04
3º Quartil	12,65	10,42	0,39	0,1	28,5	5,44	60,3	4,31

Linfócitos T

Avaliamos a expressão do marcador CD3 nos doadores dos três grupos estudados. A análise da expressão deste marcador em porcentagem demonstra que houve diferença significativa ($p=0,05$) entre os indivíduos saudáveis (CTL), [M: 80,50 (57,70-84,80)] em comparação ao grupo dos indivíduos infectados com HAM/TSP [M: 38,40 (22,50-81,10)]. Sem diferenças na comparação entre assintomáticos e controles, e entre assintomáticos e HAM/TSP. Não observamos diferença significativa para os nas frequências de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (tabela 3a).

Figura 6: A) *Frequência de linfócitos T (CD3+) em células mononucleares do sangue periférico.* Gráfico representativo da frequência de linfócitos T (CD3+) em células mononucleares do sangue periférico. Demonstra redução significativa na frequência destas células em portadores da HAM/TSP, quando comparados ao grupo dos infectados assintomáticos e controles. Sem diferenças na comparação entre assintomáticos e controles. B) *Frequência de linfócitos CD4+ na subpopulação de linfócitos T (CD3+).* Gráfico representativo da frequência de linfócitos T CD4+ em células mononucleares do sangue periférico. Demonstra que não houve alteração significativa na frequência destas células nos portadores de HAM/TSP, em comparação aos infectados assintomáticos e controles. C) *Frequência de linfócitos CD8+ na subpopulação de linfócitos T (CD3+).* Gráfico representativo da frequência de células T CD8+ em células mononucleares do sangue periférico. Demonstra que não houve alteração significativa na frequência destas células nos portadores de HAM/TSP em comparação ao grupo dos infectados assintomáticos e controles.

Avaliação da Expressão de PD-1 nos Linfócitos T

Avaliamos o marcador PD-1, que é expresso em decorrência da ativação celular ou exaustão. Não foram observadas diferenças significativas entre os indivíduos saudáveis (CTL), em comparação aos grupos de indivíduos infectados pelo HTLV assintomáticos e HAM/TSP (**tabela 3a**).

Figura 7: A) *Frequência de linfócitos T (CD3+) expressando marcador PD-1 em células mononucleares do sangue periférico.* Gráfico representativo da frequência de linfócitos CD3+PD1+ em células mononucleares do sangue periférico. Demonstra que não houve alteração significativa na expressão de PD-1 nos linfócitos T nos portadores de HAM/TSP, quando comparados aos infectados assintomáticos e controles. B) *Frequência de linfócitos T CD4+ expressando marcador PD-1.* Gráfico representativo da frequência de células T CD4+PD1+ em células mononucleares do sangue periférico. Demonstra que não houve alteração significativa na expressão de PD-1 nos linfócitos T CD4 de portadores de HAM/TSP, quando comparados aos infectados assintomáticos e controles. C) *Frequência de linfócitos T CD8+ expressando marcador PD-1.* Gráfico representativo da frequência de células T CD8+PD1+ em células mononucleares do sangue periférico. Demonstra que não houve alteração significativa na expressão de PD-1 nos linfócitos T CD8 dos portadores de HAM/TSP, quando comparados aos infectados assintomáticos e controles.

Avaliação da frequência de Células NKT em células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

As células NKT foram identificadas neste trabalho pela expressão da molécula CD3⁺ e duplo-positivas para os marcadores Vα24 e Vβ11 (CD3⁺Vα24⁺Vβ11⁺).

Observamos ao analisar a frequência de NKT que os infectados desenvolvedores da HAM/TSP apresentam reduzida frequência de células NKT [0,03 (0,01-0,09)] em relação aos infectados assintomáticos [M: 0,10 (0,04-0,26)]. Sem diferenças nas comparações entre HAM/TSP x assintomáticos e HAM/TSP x controles ($p < 0,05$) (**figura 3-b & tabela 3a**).

Como mencionado na introdução, às células NKT apresentam subpopulações. Estas subpopulações são caracterizadas pelos marcadores CD4 e CD8. Ao analisarmos as subpopulações CD4⁺, CD8⁺ e a dupla positiva (CD4⁺CD8⁺), não observamos diferença significativa entre os grupos (**tabela 3a**). No entanto, quando realizamos a análise das subpopulações duplo negativas para CD4 e CD8 (CD4⁻CD8⁻), observamos que os indivíduos assintomáticos [M: 21,70 (3,67-44,85)] apresentam menor porcentagem destas células na periferia quando comparados com indivíduos saudáveis [M: 47,30 (25,40-60,60)] ($p < 0,05$) (**figura 3-c & tabela 3a**).

Figura 8: A) Gráfico de citometria demonstrando a frequência de células NKT na subpopulação de linfócitos T (CD3+). Gráfico de citometria representativo da frequência de células NKT nos grupos Controle, Assintomático e HAM/TSP. **B) Frequência de células NKT na subpopulação de linfócitos T.** Gráfico representativo da frequência de células NKT na subpopulação de linfócitos T, demonstrando redução na frequência destas células em portadores de HAM/TSP, quando comparados ao grupo dos controles, sem alterações na comparação entre assintomáticos e controles. **C) Frequência de células NKT CD4-/CD8- na subpopulação de células NKT.** Gráfico representativo da frequência de células NKT CD4-/CD8- na subpopulação de células NKT, demonstrando que não houve alteração significativa na frequência destas células em portadores de HAM/TSP, quando comparados ao grupo dos infectados assintomáticos e controles. Todavia, observa-se redução na frequência de NKT CD4-/CD8- em pacientes infectados assintomáticos em relação aos controles.

Avaliação da Expressão de PD-1 em células NKT (CD3+Va24+Vβ11+)

Avaliamos o marcador PD-1 que é expresso em decorrência da ativação celular. Não observamos diferenças significativas na expressão do PD-1 pelas células NKT de indivíduos saudáveis (CTL) em comparação com infectados assintomáticos e HAM/TSP. Não observamos também significância nas subpopulações de NKT (tabela 3a).

Figura 9: A) Frequência de células NKT expressando PD1. Gráfico representativo da frequência de células NKT PD-1+ na subpopulação de células NKT, demonstrando que não houve alteração significativa na frequência destas células em portadores de HAM/TSP, quando comparados aos infectados assintomáticos e controles. **B) Frequência de células NKT CD4+ expressando PD1.** Gráfico representativo da frequência de células NKT CD4+PD-1+ na subpopulação de células NKT, demonstrando que não houve alteração significativa na frequência destas células em portadores de HAM/TSP, quando comparados aos infectados assintomáticos e controles. **C) Frequência de células NKT CD8+ expressando PD1.** Gráfico representativo da frequência de células NKT CD8+PD-1+ na subpopulação de células NKT, demonstrando que não houve alteração significativa na frequência destas células nos portadores de HAM/TSP, quando comparados aos infectados assintomáticos e controles.

Avaliação da secreção de IFN- γ e granzima B pelas células NKT

A realização da análise intracelular de citocinas por citometria de fluxo se torna apropriada para verificarmos se realmente há secreção de citocinas pelas células NKT. Devido à estratégia utilizada observamos que não houve diferença significativa de secreção de IFN- γ e granzima B nos grupos estudados. O estudo foi realizado utilizando um estímulo não específico como PMA/ionomicina, um estímulo específico α -GalactosilCeramida, e células não estimuladas para comparação dos resultados obtidos antes e após estimulação. Não observamos também qualquer modificação em relação ao linfócitos T (CD3+) (**tabela 3b**).

Figura 10: *A) Avaliação da indução de Granzima B por células NKT após estimulação com PMA/Ionomicina.* Após estimulação com PMA/Ionomicina, não se observou diferenças significativas na indução de Granzima B nas células NKT dos portadores de HAM/TSP, quando comparados aos infectados assintomáticos e controles. *B) Avaliação da indução de Granzima B em células NKT após estimulação com α -GalactosilCeramida.* Após estimulação com α -GalactosilCeramida, não se observou diferenças significativas na indução de Granzima B pelas células NKT dos portadores de HAM/TSP, quando comparados aos infectados assintomáticos e controles. *C) Avaliação da indução de IFN- γ em células NKT após estimulação com PMA/Ionomicina.* Após estimulação com PMA/Ionomicina, não se observou diferenças significativas na indução de IFN- γ pelas células NKT dos portadores de HAM/TSP, quando comparados aos infectados assintomáticos e controles. *D) Avaliação da indução de IFN- γ em células NKT após estimulação com α -GalactosilCeramida.* Após estimulação com α -GalactosilCeramida, não se observou diferenças significativas na indução de IFN- γ pelas células NKT dos portadores de HAM/TSP, quando comparados aos infectados assintomáticos e controles.

Avaliação da secreção de Interferon Gama (IFN γ) por Elispot

Visando avaliar funcionalmente as células NKT, avaliamos a secreção de citocinas pelas células NKT por meio da técnica de ELISPOT utilizando estímulo específico para NKT α -GalactosilCeramida. Não observamos diferenças significativas na secreção de IFN γ comparando os grupos de doadores controles não infectados (CTL) em comparação com infectados assintomáticos e infectados com HAM/TSP. Os resultados foram normalizados para 10^6 CMSP após subtração dos valores encontrados nos poços não estimulados.

Figura 11: Avaliação da secreção de IFN- γ após estimulação com estímulo específico para células NKT α -GalactosilCeramida. Não observamos diferenças significativas na secreção de IFN- γ entre os grupos controle não infectados, infectados assintomáticos e infectados com HAM/TSP após estimulação com α -GalactosilCeramida ($p=0,3714$).

DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

O HTLV é um vírus demasiadamente importante. Apesar de sua pouca divulgação, ele está presente em grandes proporções no Brasil, infectando um número ainda indefinido de pessoas que pode variar entre 300.000 (10) e 2,5 milhões de indivíduos, (70) de modo que a grande maioria destes infectados não são diagnosticados, e estes se apresentam como portadores assintomáticos da infecção. (5)

Aproximadamente 95% dos infectados permanece no estado assintomático e cerca de 5% virá à desenvolver alguma patologia associada ao HTLV. Duas são as principais doenças por ele causadas, e são a Malignidade de células T do adulto que se manifesta como leucemia/linfoma (conhecida pela sigla ATLL) e a Mielopatia associada ao HTLV (representada pela sigla HAM/TSP). (5)

Tratando da HAM/TSP, foco de estudo deste trabalho, não se sabem ao certo quais mecanismos da infecção fazem com que um indivíduo infectado permaneça assintomático ou desenvolva a doença. As informações presentes na literatura até o momento apontam para uma intensa participação do sistema imune no desenvolvimento da patologia, onde observa-se a atividade de várias populações celulares, sendo os linfócitos T os principais envolvidos.

Dentro da população dos linfócitos T há a subpopulação de células NKT, conhecida por expressar marcadores de células NK em sua superfície e também por compartilhar características funcionais com células T e NK, (63) cuja participação na HAM/TSP ainda é obscura.

Estas células, as NKTs, são conhecidas por sua versatilidade, sendo que podem atuar tanto através da produção de citocinas (46, 51, 68) quanto por meio de citotoxicidade, (48, 66) possuindo também a habilidade de atuar precocemente mediante a um estímulo (71) e a capacidade de atuar frente a uma ampla gama de patologias, dentre as quais citam-se doenças infecciosas, parasitárias, autoimunes, câncer e asma. (59, 63) Na EAE (modelo murino para esclerose múltipla) é bem descrito o papel das NKT, e sabe-se que estas podem exercer tanto função protetora, quanto patogênica, dependendo do momento de ativação das mesmas e das citocinas por ela secretadas. Nesta doença, se as NKTs estiverem previamente ativas antes do surgimento de doença, na vigência da EAE estas agiriam em caráter protetor pela secreção de IL-4. Por outro lado, Se as NKTs forem ativadas concomitantemente ao surgimento de doença, na vigência da EAE estas agiriam em caráter patogênico através da secreção de IFN- γ . (72)

Quanto à HAM/TSP não se conhece o exato mecanismo de participação das NKTs e isto motivou nosso objetivo maior, que é avaliar funcionalmente as NKTs nesta doença, bem como estudar suas frequências e fenótipos.

Para atingirmos os objetivos propostos, optamos pela avaliação das células NKT no sangue periférico dos doadores, devido à disponibilidade prévia de amostras e sua facilidade de obtenção. De modo a realizarmos avaliação mais fidedigna, em nossa coorte procuramos normalizar as

características dos doadores em relação às características da doença, (5) e com isso construímos nossa coorte composta por mulheres em sua maioria, e por pessoas com idades mais elevadas (**Tabela 2**).

Iniciamos nosso estudo avaliando a frequência de células NKT no sangue periférico dos doadores, e observamos que os portadores de HAM/TSP possuem redução significativa na frequência de NKT, quando comparados aos infectados assintomáticos e controles não infectados (**Fig. 8-a**).

Não se sabem ao certo quais as implicações práticas desta redução, pois estas células poderiam estar exercendo tanto papel protetor, quanto papel patogênico no curso da infecção e doença. Na infecção pelo vírus HIV – outra infecção retroviral - redução semelhante fora observada nos infectados, e esta ocorre em paralelo à elevação da carga viral, favorecendo assim a infecção, apontando para uma participação patogênica das NKT. (59, 73)

Na infecção pelo HTLV, dois outros trabalhos - Carvalho (2009) e Azakami (2009) - foram postulados relativos á avaliação de frequência de NKT na HAM/TSP, e nossos resultados são semelhantes aos trabalhos anteriores, de modo que nós, assim como a literatura, apontamos também redução na frequência de NKTs periféricas (50, 69). Conforme demonstrado por Azakami (2009), as NKTs podem ser infectadas pelo HTLV (50) e desta forma, podem se tornam possíveis alvos da citotoxicidade mediada por células T CD8 – HTLV – específicas. (74, 75) Por outro lado, as NKTs poderiam ter migrado para o sistema nervoso central (SNC), onde elas participariam da HAM/TSP, embora não se saiba exatamente qual seria seu papel neste sítio.

Esta teoria é plausível, uma vez que observamos nos pacientes com HAM/TSP todas as características necessárias para o desenvolvimento da doença, das quais falaremos a seguir. Primeiramente, pacientes portadores de HAM/TSP possuem, no sangue periférico, altos níveis de quimiocinas induzidas por IFN- γ , e estas são capazes de induzir a migração celular para o SNC, (42, 76) e neste sítio as células infectadas são capazes de romper a BHE (Barreira hemato encefálica) permitindo a entrada celular. (77) No interior do SNC, a produção de IFN- γ e TNF α , associada à lise das células infectadas poderia danificar células gliais e neurônios, (78, 79) concomitantemente à reatividade cruzada da IgG contra proteínas neuronais. (80) Isto tudo em paralelo às alterações funcionais e numéricas de outras subpopulações linfocitárias da periferia. (40, 41, 45) Gradativamente, todos estes fatores em conjunto poderiam gerar lesões no SNC, que à longo prazo ocasionariam a HAM/TSP.

Cientes das possíveis participações das NKT no curso da HAM/TSP, optamos por conhecer também as subpopulações de NKT presentes no sangue periférico destes pacientes.

As subpopulações mais bem descritas de NKT são classificadas de acordo com a expressão de CD4 e CD8, sendo que tais marcadores são também preditores da capacidade funcional da referida subpopulação. As NKT CD4 são conhecidas por sua habilidade em secretarem citocinas de perfil Th1 e Th2, as NKT CD8+ e CD4-CD8- são referidas por sua capacidade citotóxica e Th1.

Analisando tais subpopulações, não observamos diferenças nas frequências NKT CD4, NKT CD8 e NKT CD4⁺CD8⁺ (**Fig. 8-b, c & d**). Outros trabalhos avaliaram tais subpopulações durante a HAM/TSP, e diferentemente do nosso estudo, demonstraram maior frequência de NKT CD4⁺. (69)

Apesar das diferenças nos resultados encontrados em relação à literatura, nossos dados quanto às subpopulações de NKT (CD4 e CD8) são válidos. Em nossos experimentos para avaliação de frequência, não nos utilizamos das técnicas de estimulação ou expansão prévia de NKTs, uma vez que a expansão in vitro poderia ser considerada um interferente capaz de alterar o perfil fenotípico das mesmas. (55) Descartamos também a possibilidade de problemas experimentais através dos controles metodológicos utilizados, e o nosso N amostral é suficiente para a análise dos dados. Com isso, concluímos que as diferenças observadas são características inerentes aos participantes da nossa pesquisa.

Observamos ainda que os pacientes assintomáticos têm menor frequência de células NKT CD4⁺CD8⁺ (**Fig. 8-e**). Tais células representam a maior subpopulação de NKT do sangue periférico (55) e são conhecidas por sua capacidade de secretarem citocinas de perfil Th1 e realizar citotoxicidade. (48, 51, 58, 59, 66) Sua depleção nos assintomáticos nos projeta novamente ao dúbio potencial de atuação das NKT na doença, sendo que tal subpopulação (NKT CD4-CD8-) poderia agir de modo a proteger da doença ou favorecer o curso da patologia. Nesse contexto, tendo em vista as características da HAM/TSP, acreditamos que a depleção das NKT CD4-CD8- seja ocasionada por seu papel protetor, sendo possível que estas tenham sido depletadas em decorrência de resposta imune antiviral nos assintomáticos, como uma tentativa inicial de conter o progresso da infecção.

Buscando entender o estado de ativação das NKTs nos doadores estudados, escolhemos o marcador de ativação/exaustão celular PD-1 para tal análise.

Em condições fisiológicas, esta molécula é induzida na superfície de vários tipos celulares como células T, células B, monócitos e dendríticas em decorrência de sua ativação e atua modulando as funções da célula previamente ativada, portanto, alterações na sua expressão podem indicar alterações nas funções celulares. Primeiramente sua alta expressão pode indicar exaustão imunológica, pois a célula ativada expressa tal molécula como uma tentativa de autorregulação, e em oposição, a baixa expressão desta molécula permite que a célula se torne superativada uma vez que não haverá nesta um mecanismo de autorregulação. (81)

Sabemos que, nos indivíduos com HTLV há elevada expressão de PD-1 em células T, e esta é associada à exaustão celular, provavelmente em resposta à infecção. (41) Sabendo que as NKTs são uma subpopulação de linfócitos T, realizamos a análise deste marcador nesta população. Não observamos em nosso trabalho alterações na expressão de PD-1 pelas células NKTs dos infectados em seu estado basal (**Fig. 9-a**), nem tampouco nas suas subpopulações NKT CD4⁺ (**Fig. 9-b**) e NKT CD8⁺ (**Fig. 9-c**). Uma vez que, não vimos diferenças quanto ao estado de ativação basal das NKT, buscamos saber qual era o seu potencial de atuação quando – futuramente – ativadas, avaliando se estas possuíam capacidade efetora.

Conforme mencionado acima, em outra doença degenerativa do SNC, a esclerose múltipla, (82) observamos a duplicidade de papéis das NKT sendo que as elas agiriam em caráter patogênico através da secreção de IFN- γ . (72)

Na HAM/TSP já é bem descrita a participação do IFN- γ , de modo que vários trabalhos apontam que os pacientes infectados pelo HTLV possuem elevada produção de IFN- γ pelas células T (42-44, 74, 83). Com base nisso pressupomos que as NKTs nesta patologia estariam atuando de forma semelhante, e realizamos avaliação da indução e secreção desta. Sabendo ainda que na infecção pelo HTLV a capacidade citolítica das NKTs é alterada, (50) buscamos também avaliar sua capacidade citotóxica durante a infecção a fim de melhor estabelecer o perfil funcional das mesmas.

Para realização destas avaliações, pesquisamos estímulos para promover ativação das NKT, de modo a simular experimentalmente as suas capacidades funcionais. Primeiramente, pressupondo que as NKT pudessem estar liberando os grânulos de IFN- γ e Granzima B, optamos por realizar avaliação da secreção destes analitos, e para isto, utilizamos inicialmente a técnica de ELISPOT após estímulo com α -GalCer. Esta molécula, α -GalCer, previamente descrita na introdução, ativa as NKTs fazendo com que estas produzam várias citocinas incluindo IFN- γ , (48, 71) proliferem clonalmente, (48) promovam citotoxicidade, (48, 66) além de induzirem indiretamente a função citotóxica em outras células. (48)

Estimulando as NKTs com α -GalCer, não observamos em nosso estudo diferenças na secreção de IFN- γ (**Fig. 11**) e Granzima B (**Fig. 12**) entre os grupos estudados. Porém, com a técnica de ELISPOT, não conseguimos precisar qual população celular está secretando os analitos, uma vez que as NKTs ativadas são capazes de induzir outras células à secretarem o mesmo. De modo geral, tais proteínas poderiam ser produzidas por qualquer população de mononucleares, uma vez que as NKTs têm a capacidade de modular a atuação de vários tipos celulares como NK, células T CD4, T CD8, (84) e monócitos. (85, 86)

Buscamos então uma avaliação mais aprimorada, e esta realizamos através da metodologia de imunofenotipagem intracelular, que permite identificação de qual população celular produz o analito. Para tanto, utilizamos como estímulo PMA/Ionomicina e α -GalCer. PMA/Ionomicina é um estímulo inespecífico que ativa linfócitos T e outras populações diretamente através da atuação na proteína quinase C (PKC), sendo usado como nosso controle positivo. (87) Com este estímulo, também não observamos diferenças significativas na produção de IFN- γ (**Fig. 10-c**) e Granzima B (**Fig. 10-a**) comparando HAM/TSP, infectados assintomáticos e controles.

Todavia, PMA/Ionomicina - como mencionado anteriormente - é um estímulo inespecífico, e, a fim de apurarmos ainda mais a nossa análise, optamos por também utilizar α -GalCer, que é específico para NKTs. Estimulando com α -GalCer - estímulo específico - novamente não observamos diferenças na produção de IFN- γ (**Fig 10-d**) e Granzima B (**Fig.10-b**).

Em dados concretos, nossos resultados até aqui nos mostram que as NKTs não estão no sangue periférico, em especial a população NKT CD4-CD8-, e tampouco são atuantes neste sítio

através da indução ou secreção de IFN- γ e Granzima B. Tais achados em conjunto também corroboram nossos dados anteriores do marcador PD-1, onde também não foram observadas diferenças no estado de ativação das NKTs periféricas no curso da infecção/doença. Embora não se saiba ao certo qual o destino tomado pelas NKTs. O fato de as NKT não estarem secretando ou produzindo IFN- γ e Granzima B, nem tampouco ativadas no sangue periférico pode sugerir que estejam presentes no SNC, mas também pode sugerir que tenham sido ativadas em fases iniciais da infecção (na fase assintomática) devido ao seu potencial de ativação precoce. (71) Pode-se supor ainda que as NKTs agissem como na “contenção” da progressão da infecção, e – da mesma forma que no HIV - com sua queda, a infecção pôde se estabelecer através da elevação da carga viral. (59, 73)

Aprofundando nossa análise, avaliamos as frequências, fenótipo e funções dos linfócitos T (CD3⁺) e foi realizada tendo em vista a disponibilidade técnica para realização da mesma visando aprimorar os resultados obtidos.

Com tal análise, constatamos num primeiro olhar a existência de queda significativa na frequência de células T nos indivíduos portadores de HAM/TSP (**Fig. 6-a**), comparados aos outros grupos. Tal alteração pode ser parcialmente explicada através das teorias de morte celular e/ou migração para o SNC – assim como sugerimos para as NKT. Contudo, para melhor explicar sobre tal alteração, tornou-se interessante avaliar as subpopulações clássicas de células T que são T CD4 e T CD8, conhecidas por sua capacidade auxiliar e efetora respectivamente. (31)

Assim como Carvalho (2009), também não observamos alterações significativas na frequência de células T CD4 (**Fig. 6-b**) e T CD8 (**Fig. 6-c**) derivadas dos pacientes com HAM/TSP em relação aos outros grupos. (69) Contudo, neste artigo citado não foi avaliada a capacidade funcional das células T. Com essa finalidade, em nosso trabalho avaliamos também a funcionalidade das células T dos infectados por HTLV, onde às avaliamos em seu estado basal – por meio do PD-1 - e mediante estimulação com PMA/Ionomicina e α -GalCer buscando avaliar produção de IFN- γ e GB.

Os dados obtidos da avaliação das células T apontam para ausência de ativação destas na periferia, mesmo em decorrência da infecção. De modo semelhante às células NKTs, não observamos alteração na expressão de PD-1 nas células T (**Fig. 7-a**), T CD4 (**Fig. 7-b**) ou T CD8 (**Fig. 7-c**), tampouco alterações na produção de IFN- γ e Granzima B nas mesmas populações celulares dos indivíduos com HAM/TSP e/ou infectados (**dados não mostrados**). Existem alterações funcionais em células T comprovadas na literatura como a disfunção da capacidade citolítica das CD8, (40, 41) proliferação exacerbada, (45) e produção de IFN- γ pelas TCD8 (74) e TCD4 (42, 44, 83), (43) são as mais proeminentes. Todavia, em nosso trabalho não constatamos tais alterações.

Em suma, nossos dados mostram a ausência de ativação celular na periferia dos pacientes com HAM/TSP e assintomáticos, e remetem para uma possível ativação celular nas fases mais precoces da infecção, bem como para uma migração ao sítio acometido, o SNC. Neste contexto, nosso estudo vem para acrescentar informações ao *puzzle* que é a patogenia da HAM, além de apontarem para a

necessidade de melhores e mais aprofundados estudos para elucidar a mesma, pois até o momento não existem vacinas e tratamentos específicos para esta doença, muito menos, existe cura para tal mazela.

Anexos

Anexo 1 – Parecer consubstanciado do Comitê de ética em pesquisa (CEP)

<p align="center"> HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP </p>

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Funcionalidade das Células T Natural Killer NKT na fisiopatogenia da Mielopatia associada ao HTLV/ Paraparesia Tropical Espástica (HAM/TSP)

Pesquisador: Karina Inacio Ladislau de Carvalho Salmazi

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 10302713.2.1001.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 368.027

Data da Relatoria: 21/08/2013

Apresentação do Projeto:

Projeto : Funcionalidade das Células T Natural Killer NKT na fisiopatogenia da Mielopatia associada ao HTLV/ Paraparesia Tropical Espástica (HAM/TSP).

Trata-se de um estudo transversal, descritivo, em que serão feitas análises quantitativas e qualitativas do perfil fenotípico e funcional das células natural killer T (NKT) de pacientes infectados pelo vírus HTLV (vírus linfotrópico de células T humanas) e acometidos de paraparesia tropical espástica ou mielopatia associada ao HTLV (HAM/TSP).

Na a metodologia serão utilizadas amostras previamente armazenadas, remanescentes de estudo anterior já aprovado pela CAPPEsq. Haverá uso de fontes secundárias de dados: prontuários e dados de exames laboratoriais. Também serão incluídos controles saudáveis para comparação. Serão avaliados neste Centro: 50 casos, incluindo-se nesta casuística doentes, portadores assintomáticos da infecção

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar			
Bairro: Cerqueira Cesar	CEP: 05.403-010		
UF: SP	Município: SAO PAULO		
Telefone: (11)2561-7585	Fax: (11)2561-7585	E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br	

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 368.027

HTLV e

Indivíduos saudáveis.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: estudar a interação funcional das células NKT na patogênese da HAM/TSP.

Objetivos secundários: definir o padrão de citocinas nas subpopulações de células NKT e correlacionar com aspectos clínicos da doença HAM/TSP; verificar se as células NKT tem perfil citotóxico na doença HAM/TSP e definir se, na expansão in vitro das células NKT, estas permanecem com o mesmo perfil funcional.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este vírus é endêmico em várias regiões e há necessidade de mais estudos sobre a fisiopatogenia da HAM/TSP. O trabalho é bem planejado e conta com recursos materiais e humanos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado

Recomendações:

Aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12, cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA
USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 368.027

a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 22 de Agosto de 2013

Assinador por:
Lutz Eugênio Garcez Leme
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kannian P, Green PL. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses*. 2010;2(9):2037-77.
2. Ho DD, Rota TR, Hirsch MS. Infection of human endothelial cells by human T-lymphotropic virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(23):7588-90.
3. Casoli C, Pilotti E, Bertazzoni U. Molecular and cellular interactions of HIV-1/HTLV coinfection and impact on AIDS progression. *AIDS Rev*. 2007;9(3):140-9.
4. Kannian P, Fernandez S, Jones KS, Green PL. Human T Lymphotropic Virus Type 1 SU Residue 195 Plays a Role in Determining the Preferential CD4+ T Cell Immortalization/Transformation Tropism. *J Virol*. 2013;87(16):9344-52.
5. Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*. 2005;24(39):6058-68.
6. Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(12):3618-22.
7. Hattori S, Kiyokawa T, Imagawa K, Shimizu F, Hashimura E, Seiki M, et al. Identification of gag and env gene products of human T-cell leukemia virus (HTLV). *Virology*. 1984;136(2):338-47.
8. Rafatpanah H, Farid R, Golanbar G, Jabbari Azad F. HTLV-I Infection: virus structure, immune response to the virus and genetic association studies in HTLV-I-infected individuals. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2006;5(4):153-66.
9. 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;91(3):1124-7.
10. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol*. 2012;3:388.
11. Sonoda S, Li HC, Tajima K. Ethnoepidemiology of HTLV-1 related diseases: ethnic determinants of HTLV-1 susceptibility and its worldwide dispersal. *Cancer Sci*. 2011;102(2):295-301.
12. Li HC, Fujiyoshi T, Lou H, Yashiki S, Sonoda S, Cartier L, et al. The presence of ancient human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA in an Andean mummy. *Nat Med*. 1999;5(12):1428-32.
13. Dourado I, Alcantara LCJ, Barreto ML, Teixeira MdG, Galvão-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;34(5):527-31.
14. Guia de Manejo Clínico de Paciente com HTLV, (2003).
15. NORMAS TÉCNICAS HEMOTERAPIA, Stat. PORTARIA Nº 1.376 (19 de novembro de 1993).
16. Pique C, Jones KS. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front Microbiol*. 2012;3:378.
17. Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med*. 2010;16(1):83-9.
18. Van Prooyen N, Gold H, Andresen V, Schwartz O, Jones K, Ruscetti F, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(48):20738-43.
19. 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;299(5613):1713-6.
20. 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;80(14):6844-54.
21. Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell*. 2003;115(4):449-59.
22. Norris PJ, Hirschhorn DF, DeVita DA, Lee TH, Murphy EL. Human T cell leukemia virus type 1 infection drives spontaneous proliferation of natural killer cells. *Virulence*. 2010;1(1):19-28.

23. 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;77(12):7415-9.
24. Matsuoka M, Jeang KT. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):270-80.
25. Satou Y, Matsuoka M. Virological and immunological mechanisms in the pathogenesis of human T-cell leukemia virus type 1. *Rev Med Virol*. 2013;23(5):269-80.
26. Costa DT, Santos AL, Castro NM, Siqueira IC, Carvalho Filho EM, Glesby MJ. Neurological symptoms and signs in HTLV-1 patients with overactive bladder syndrome. *Arq Neuropsiquiatr*. 2012;70(4):252-6.
27. Oliveira P, Castro NM, Muniz AL, Tanajura D, Brandão JC, Porto AF, et al. Prevalence of erectile dysfunction in HTLV-1-infected patients and its association with overactive bladder. *Urology*. 2010;75(5):1100-3.
28. Nascimento MC, Primo J, Bittencourt A, Siqueira I, de Fátima Oliveira M, Meyer R, et al. Infective dermatitis has similar immunological features to human T lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Clin Exp Immunol*. 2009;156(3):455-62.
29. Yakova M, Lézin A, Dantin F, Lagathu G, Olindo S, Jean-Baptiste G, et al. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. *Retrovirology*. 2005;2:4.
30. Montes M, Sanchez C, Verdonck K, Lake JE, Gonzalez E, Lopez G, et al. Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(6):e456.
31. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Cellular and molecular Immunology*. 6th ed 2007.
32. Saito M. Neuroimmunological aspects of human T cell leukemia virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol*. 2013.
33. Levin MC, Jacobson S. HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): a chronic progressive neurologic disease associated with immunologically mediated damage to the central nervous system. *J Neurovirol*. 1997;3(2):126-40.
34. Nakagawa M, Izumo S, Ijichi S, Kubota H, Arimura K, Kawabata M, et al. HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *J Neurovirol*. 1995;1(1):50-61.
35. Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol*. 1998;4(6):586-93.
36. Castro Costa C, Santos T. *Tropical spastic paraparesis (or HTLV-I associated myelopathy - TSP/HAM)*. *REVISTA BRASILEIRA DE MEDICINA*. 9 ed 2003. p. 703 - 8.
37. Ribas JGR, Melo GCNd. [Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(4):377-84.
38. Lima CL, Rabolini G, Menna-Barreto M, Dos Santos EB, Koff WJ. Urodynamic alterations in patients with HTLV-1 infection. *Int Braz J Urol*. 2002;28(5):452-6; discussion 6-7.
39. Moreno-Carvalho OA. Brain white matter lesions in HAM/TSP: do they have any special meaning? *Arq Neuropsiquiatr* 2012. p. 241-2.
40. Sabouri AH, Usuku K, Hayashi D, Izumo S, Ohara Y, Osame M, et al. Impaired function of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD8+ T cells in HTLV-1-associated neurologic disease. *Blood*. 2008;112(6):2411-20.
41. 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.
42. Ando H, Sato T, Tomaru U, Yoshida M, Utsunomiya A, Yamauchi J, et al. Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain*. 2013.

43. Leal FE, Ndhlovu LC, Hasenkrug AM, Bruno FR, Carvalho KI, Wynn-Williams H, et al. Expansion in CD39⁺ CD4⁺ immunoregulatory t cells and rarity of Th17 cells in HTLV-1 infected patients is associated with neurological complications. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(2):e2028.
44. 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.
45. Santos SB, Porto AF, Muniz AL, de Jesus AR, Magalhães E, Melo A, et al. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC Infect Dis*. 2004;4:7.
46. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med*. 2002;195(5):625-36.
47. Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4⁺ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med*. 1994;180(3):1097-106.
48. Rogers PR, Matsumoto A, Naidenko O, Kronenberg M, Mikayama T, Kato S. Expansion of human Valpha24⁺ NKT cells by repeated stimulation with KRN7000. *J Immunol Methods*. 2004;285(2):197-214.
49. Kinjo Y, Tupin E, Wu D, Fujio M, Garcia-Navarro R, Benhnia MR, et al. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat Immunol*. 2006;7(9):978-86.
50. Azakami K, Sato T, Araya N, Utsunomiya A, Kubota R, Suzuki K, et al. Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders. *Blood*. 2009;114(15):3208-15.
51. Sandberg JK, Bhardwaj N, Nixon DF. Dominant effector memory characteristics, capacity for dynamic adaptive expansion, and sex bias in the innate Valpha24 NKT cell compartment. *Eur J Immunol*. 2003;33(3):588-96.
52. Brennan PJ, Tatituri RV, Brigl M, Kim EY, Tuli A, Sanderson JP, et al. Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. *Nat Immunol*. 2011;12(12):1202-11.
53. Budd RC, Miescher GC, Howe RC, Lees RK, Bron C, MacDonald HR. Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes. *J Exp Med*. 1987;166(2):577-82.
54. Berzins SP, Uldrich AP, Pellicci DG, McNab F, Hayakawa Y, Smyth MJ, et al. Parallels and distinctions between T and NKT cell development in the thymus. *Immunol Cell Biol* 2004. p. 269-75.
55. Chan AC, Leeansyah E, Cochrane A, d'Udekem d'Acoz Y, Mittag D, Harrison LC, et al. Ex-vivo analysis of human natural killer T cells demonstrates heterogeneity between tissues and within established CD4(+) and CD4(-) subsets. *Clin Exp Immunol*. 2013;172(1):129-37.
56. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest*. 2004;114(10):1379-88.
57. Benlagha K, Kynin T, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. A thymic precursor to the NK T cell lineage. 2002 Apr. Report No.: 1095-9203 Contract No.: 5567.
58. Kuylenstierna C, Björkström NK, Andersson SK, Sahlström P, Bosnjak L, Paquin-Proulx D, et al. NKG2D performs two functions in invariant NKT cells: direct TCR-independent activation of NK-like cytotoxicity and co-stimulation of activation by CD1d. *Eur J Immunol*. 2011;41(7):1913-23.
59. Juno JA, Keynan Y, Fowke KR. Invariant NKT cells: regulation and function during viral infection. *PLoS Pathog*. 2012;8(8):e1002838.
60. Kee SJ, Park YW, Cho YN, Jin HM, Kim MJ, Lee SJ, et al. Age- and gender-related differences in circulating natural killer T cells and their subset levels in healthy Korean adults. *Hum Immunol*. 2012;73(10):1011-6.
61. De Libero G, Mori L. How the immune system detects lipid antigens. *Prog Lipid Res*. 2010;49(2):120-7.

62. Barral P, Eckl-Dorna J, Harwood NE, De Santo C, Salio M, Illarionov P, et al. B cell receptor-mediated uptake of CD1d-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cell help in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(24):8345-50.
63. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336.
64. Mattner J, DeBord KL, Ismail N, Goff RD, Carlos Cantu I, Zhou D, et al. Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature*. 2005;434(7032):525-9.
65. Bosnjak L, Sahlström P, Paquin-Proulx D, Leeansyah E, Moll M, Sandberg JK. Contact-dependent interference with invariant NKT cell activation by herpes simplex virus-infected cells. *J Immunol*. 2012;188(12):6216-24.
66. Chen X, Wang X, Besra GS, Gumperz JE. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by CD4. *J Leukoc Biol*. 2007;82(6):1455-65.
67. Fischer K, Scotet E, Niemeyer M, Koebernick H, Zerrahn J, Maillet S, et al. Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(29):10685-90.
68. Zhu R, Diem S, Araujo LM, Aumeunier A, Denizeau J, Philadelphie E, et al. The Pro-Th1 cytokine IL-12 enhances IL-4 production by invariant NKT cells: relevance for T cell-mediated hepatitis. *J Immunol*. 2007;178(9):5435-42.
69. Ndhlovu LC, Snyder-Cappione JE, Carvalho KI, Leal FE, Loo CP, Bruno FR, et al. Lower numbers of circulating Natural Killer T (NK T) cells in individuals with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) associated neurological disease. *Clin Exp Immunol*. 2009;158(3):294-9.
70. de Thé G, Bomford R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1993;9(5):381-6.
71. Van Kaer L. alpha-Galactosylceramide therapy for autoimmune diseases: prospects and obstacles. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(1):31-42.
72. Jahng AW, Maricic I, Pedersen B, Burdin N, Naidenko O, Kronenberg M, et al. Activation of natural killer T cells potentiates or prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2001;194(12):1789-99.
73. Sandberg JK, Fast NM, Palacios EH, Fennelly G, Dobroszycki J, Palumbo P, et al. Selective loss of innate CD4(+) V alpha 24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 2002;76(15):7528-34.
74. Kubota R, Kawanishi T, Matsubara H, Manns A, Jacobson S. Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-specific CD8+ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection. *J Immunol*. 1998;161(1):482-8.
75. 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;95(13):7568-73.
76. Guerreiro JB, Santos SB, Morgan DJ, Porto AF, Muniz AL, Ho JL, et al. Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. *Clin Exp Immunol*. 2006;145(2):296-301.
77. Afonso PV, Ozden S, Prevost MC, Schmitt C, Seilhean D, Weksler B, et al. Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization. *J Immunol*. 2007;179(4):2576-83.
78. Leal FE. Alterações de subpopulações de células T CD4+ em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Biblioteca da Faculdade de Medicina da USP: Universidade de São Paulo (USP); 2012.
79. Benveniste EN, Benos DJ. TNF-alpha- and IFN-gamma-mediated signal transduction pathways: effects on glial cell gene expression and function. *FASEB J*. 1995;9(15):1577-84.

80. Levin MC, Lee SM, Kalume F, Morcos Y, Dohan FC, Hasty KA, et al. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nat Med.* 2002;8(5):509-13.
81. Yao S, Zhu Y, Chen L. Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nat Rev Drug Discov.* 2013;12(2):130-46.
82. McKay KA, Kwan V, Duggan T, Tremlett H. Risk Factors Associated with the Onset of Relapsing-Remitting and Primary Progressive Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Biomed Res Int.* 2015;2015:817238.
83. Goon PK, Hanon E, Igakura T, Tanaka Y, Weber JN, Taylor GP, et al. High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Blood.* 2002;99(9):3335-41.
84. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, et al. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol.* 1999;163(9):4647-50.
85. Hegde S, Chen X, Keaton JM, Reddington F, Besra GS, Gumperz JE. NKT cells direct monocytes into a DC differentiation pathway. *J Leukoc Biol.* 2007;81(5):1224-35.
86. Hegde S, Lockridge JL, Becker YA, Ma S, Kenney SC, Gumperz JE. Human NKT cells direct the differentiation of myeloid APCs that regulate T cell responses via expression of programmed cell death ligands. *J Autoimmun.* 2011;37(1):28-38.
87. Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J Immunol.* 1989;143(4):1283-9.