UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise da expressão de genes virais em exossomos provenientes do soro de
indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico de células T humanas
(HTLV-1)**

Suellen Gomes Salustiano

RIBEIRÃO PRETO
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise da expressão de genes virais em exossomos provenientes do soro de
indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico de células T humanas
(HTLV-1)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à
Farmácia para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientada: Suellen Gomes Salustiano

Orientadora: Profa. Dra. Simone Kashima Haddad

RIBEIRÃO PRETO

2016

<p>SALUSTIANO, S.G.</p>	<p>Análise da expressão de genes virais em exossomos provenientes do soro de indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1)</p>		<p>MESTRADO FCFRP-USP 2016</p>
-----------------------------	---	--	--

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Salustiano, Suellen Gomes

Análise da expressão de genes virais em exossomos provenientes do soro de indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1). Ribeirão Preto, 2016.

94 p. : Il. ; 30 cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: HADDAD, Simone Kashima.

1. HTLV-1. 2. Exossomos. 3. tax. 4. HBZ. 5. Soro. 6. Carga proviral

FOLHA DE APROVAÇÃO

Suellen Gomes Salustiano

Análise da expressão de genes virais em exossomos provenientes do soro de indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Simone Kashima Haddad

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, que com a sua fortaleza, infinito amor e justiça me permitiu chegar até aqui. Aos meus pais, José Leodir e Rosana, pela confiança e incentivo nas minhas escolhas. À minha irmã, Joseana, um exemplo para mim de garra e bondade. Ao meu amor, Marcelo Orlandin, e sua família que tornaram essa caminhada mais leve. Ao Grupo Profissionais do Reino, que me fizeram entender que o esforço não deve ser apenas para o sucesso, mas para ser alguém de valor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, advogado fiel, fonte infinita de amor e misericórdia. Pela proteção por todos os caminhos percorridos. Porque dele, por ele e para ele são todas as coisas.

À minha família, que sempre me incentivou a seguir os meus sonhos e me deu todo o suporte necessário para isso, apesar das circunstâncias. Pelos valores e princípios que carrego comigo e não abro mão.

À todos os pacientes do Ambulatório de Neurologia Tropical, pela confiança na pesquisa e aos médicos responsáveis pelo setor, pelo apoio que permitiu a realização das coletas das amostras.

Ao Grupo Profissionais do Reino, pelas orações e momentos de partilha.

À Profa.Dra.Simone Kashima Haddad, por todas as oportunidades a mim concedidas.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, em especial à Daiane, pela amizade, paciência, disponibilidade e ensinamentos desde o início até o fim do meu mestrado, exemplo de dedicação e companheirismo. À Evandra, pelo otimismo e auxílio nos experimentos realizados. Ao Slav, pela ajuda no desenho de *primers* e pelos momentos de descontração. À Juliana, pela companhia à Pirassununga e pelo auxílio de bancada. Ao Alex, que não mediu esforços para contribuir sempre que foi preciso. Ao Lucas, pelos momentos de desabafos e risadas. À Fernanda, pelos ensinamentos das técnicas de Biologia Molecular no início do meu estágio.

À Profa.Dra.Virgínia Picanso, pelo auxílio na estratégia experimental para a construção dos vetores.

À Sandra, pelo zelo no desenho das figuras.

À Luciana Ambrósio, gratidão pelos ensinamentos de *Western Blot* e pelo convívio durante algumas semanas. À Clarisse e à Carol, do Centro de Química de Proteínas, pela disponibilidade.

À Carmen e Dalva, pelo auxílio burocrático.

À Fundação Hemocentro, pela estrutura do laboratório.

À seção de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela competência e auxílio.

Ao CNPQ, pela bolsa de mestrado concedida.

“Existem durante nossa vida, sempre dois caminhos a seguir: aquele que todo mundo segue, e aquele que a nossa imaginação nos leva a seguir. O primeiro pode ser mais seguro, o mais confiável, o menos crítico, o que você encontrará mais amigos... mas, você será apenas mais um a caminhar. O segundo, com certeza vai ser o mais difícil, mais solitário, o que você terá maiores críticas; mas também, o mais criativo, o mais original possível. Não importa o que você seja, quem você seja, ou o que deseja na vida, a ousadia em ser diferente reflete na sua personalidade, no seu caráter, naquilo que você é. E é assim que as pessoas lembrarão de você um dia.”

Ayrton Senna

RESUMO

SALUSTIANO, S.G. **Análise da expressão de genes virais em exossomos provenientes do soro de indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1).** 2016. 94f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Duas patologias principais estão associadas ao HTLV-1: a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). O mecanismo pelo qual ocorre o desenvolvimento destas doenças em apenas 1 a 5% dos indivíduos infectados é desconhecido. Sabe-se que diversos fatores estão associados ao desenvolvimento destas patologias, como carga proviral, características celulares, genéticas e imunológicas do hospedeiro. No entanto, tais mecanismos não foram totalmente elucidados e novas abordagens de estudos são necessárias para a compreensão da patogênese viral. Nesse sentido, vários estudos relatam o papel dos exossomos no desenvolvimento de infecções virais como HIV, EBV e HCV através do transporte de componentes incluindo proteínas, RNAm e miRNA. A possibilidade da transferência do conteúdo viral por essas vesículas para células não infectadas na ausência de vírus é um mecanismo intrigante. Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo isolar os exossomos diretamente do soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e comparar o conteúdo dessas vesículas quanto à expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* entre os grupos assintomático e sintomático. Para tanto, os exossomos foram isolados por precipitação polimérica (Exoquick™) e caracterizados por *Western Blot* (expressão dos marcadores CD9, CD81, Alix e citocromo c) e Análise de Rastreamento de Nanopartículas (tamanho e concentração). Além disso, o conteúdo dos exossomos foi analisado por PCR em tempo real para quantificação dos genes virais regulatórios *tax* e *HBZ*. Por fim, no intuito de estabelecer o papel dos exossomos como biomarcadores para o desenvolvimento da HAM/TSP, os níveis de expressão destes genes foram associados à carga proviral do HTLV-1. Os transcritos de RNAm de *tax* e *HBZ* foram detectados apenas em exossomos isolados do soro dos indivíduos sintomáticos, com ausência nos assintomáticos. Além disso, a expressão de *tax* e *HBZ* nos exossomos dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 foi correlacionada positivamente com a CPV. Dessa forma, os resultados sugerem que os exossomos podem desempenhar importante papel na patogênese da mielopatia, através do transporte de genes virais de uma célula infectada para não-infectada. No entanto, mais estudos que relacionam o papel dos exossomos na infecção pelo HTLV-1 são necessários.

Palavras-chave: HTLV-1. Exossomos. *tax*. *HBZ*. Soro. Carga proviral.

ABSTRACT

SALUSTIANO, S.G. **Analysis of viral gene expression in exosomes isolated from serum of HTLV-1-infected patients.** 2016. 94f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Two major pathologies has been associated with HTLV-1 infection: adult T- cell leukemia/lymphoma (ATLL) and HTLV-1 associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis (HAM / TSP). The mechanism which is responsible for the appearance of these diseases in only 1 to 5% of the infected individuals is unknown. Is known that several factors has been related to the development of these diseases, such as proviral load and cellular, genetic and immunological characteristics of the host. However, these mechanisms have not been fully elucidated and new approaches are necessary to understand the viral pathogenesis. Thus, several studies have reported the involvement of exosomes in the development of the HIV, HCV, and EBV viral infections carrying components including proteins, mRNA and miRNA. The possibility of transfer of viral content via these vesicles to uninfected cells in the absence of virus is an intriguing mechanism. Therefore, this proposal aimed to isolate exosomes from serum of HTLV-1 infected patients and compare the content of these vesicles regarding viral gene expression of *tax* and *HBZ* between asymptomatic and symptomatic group. For this, the exosomes were isolated by polymeric precipitation (Exoquick™) and characterized by Western Blot (expression of markers CD9, CD81, and Alix) and Nanoparticle tracking Analysis (size and concentration). Furthermore, the exosomes content were analyzed by real-time PCR for the quantification of *tax* and *HBZ* regulatory viral genes. Finally, to establish the role of exosomes like biomarkers to HAM/TSP development, levels of these genes were associated with proviral load of HTLV-1. Viral mRNA transcripts including *tax* and *HBZ* were found only in exosomes isolated from serum of symptomatic individuals and absence in asymptomatic. Furthermore, *tax* and *HBZ* expression in exosomes from HTLV-1 infected individuals were positive correlated with proviral load. Thus, the results suggests that exosomes can able to develop important role in myelopathy pathogenesis carrying viral genes of infected cell to uninfected cell. However, more studies that relate the role of exosomes in HTLV-1 are needed.

Keywords: Exosomes. HTLV-1. *tax*. *HBZ*. Serum. Proviral load.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A biogênese dos exossomos.....	16
Figura 2. Delineamento da estratégia experimental.....	26
Figura 3. Descrição das etapas da construção do vetor plasmidial TOPO + β -globina + HTLV-1_pol.....	35
Figura 4. Eficiência dos métodos de ultracentrifugação e Exoquick™ de acordo com o número de partículas analisadas por NTA.....	40
Figura 5. Expressão de Alix, CD81 e CD9 por <i>Western Blot</i> em exossomos derivados do soro.....	41
Figura 6. Distribuição do tamanho e concentração das vesículas isoladas do soro humano por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA).....	42
Figura 7. Análise do RNA total exossomal e celular.....	43
Figura 8. Curva de Amplificação para os genes <i>ACTB</i> , <i>tax</i> e <i>HBZ</i> em exossomos isolados do soro de indivíduos sintomáticos e assintomáticos para o HTLV-1.....	44
Figura 9. Análise da expressão dos genes virais <i>tax</i> e <i>HBZ</i> em exossomos derivados do soro de pacientes infectados pelo HTLV-1 por PCR em tempo real.....	44
Figura 10. Gel <i>low melting</i> 2% com produtos da digestão enzimática.....	45
Figura 11. Gel <i>low melting</i> 2% com produtos do PCR.....	46
Figura 12. Sequenciamento de nucleotídeos dos fragmentos <i>pol</i> e <i>β-globina</i>	46
Figura 13. Curva padrão e de amplificação para a quantificação de <i>pol</i> e <i>β-globina</i> por PCR em tempo real.....	48
Figura 14. Distribuição da carga proviral do HTLV-1 (nº de cópias/10 ⁵ células) em pacientes assintomáticos (HAC) e sintomáticos (HAM/TSP).....	50
Figura 15. Correlação entre a expressão dos genes <i>tax</i> e <i>HBZ</i> com a CPV.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sequência de <i>primers reverse</i> para a região <i>tax</i> e <i>HBZ</i> do genoma viral e <i>ACTB β-actina</i>).....	29
Tabela 2.	Sequência de primers e sondas para a região <i>HBZ</i> do genoma viral utilizados para a PCR quantitativa.....	30
Tabela 3.	Sequência de <i>primers</i> e sondas para a região <i>pol</i> do genoma viral e para a região <i>β-globina</i>	32
Tabela 4.	Distribuição do número de indivíduos dos diferentes grupos quanto ao gênero e à idade.....	39
Tabela 5.	Curva-padrão do plasmídeo HTLV-1_ <i>pol</i> + <i>β-globina</i> obtida com diferentes diluições.....	47
Tabela 6.	Carga proviral dos indivíduos infectados pelo HTLV-1.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	β -actina
AGO	argonauta
ANXA	anexina
APP	proteína precursora da amiloide
ATL	leucemia de células T do adulto
AP-1	proteína ativadora 1
CANX	calnexina
cDNA	DNA complementar
CPV	carga proviral
C _t	<i>cycle threshold</i>
CT	indivíduos controle
CYC	citocromo c
DLS	dispersão de luz dinâmica
EBV	vírus Epstein-Barr
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
DNA	ácido desoxirribonucléico
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GLUT-1	transportador de glicose 1
GM130	proteína da matriz de Golgi
HAC	carreador assintomático do vírus linfotrópico de células T humanas
HAM/TSP	mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical
HCV	vírus da hepatite C
HISTH	histona H
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HSPG	heparan sulfato-proteoglicano
HSP90B1	proteína de choque térmico
HTLV-1	vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1
HTLV-2	vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2
HTLV-3	vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 3
HTLV-4	vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 4
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1

IFN- γ	interferon-gama
IL-6	interleucina-6
ILV	vesícula intraluminal
ISEV	Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares
JSI-124	cucurbitacina I
LFA-1	antígeno associado à função do linfócito
LMP1	proteína latente de membrana
LTR	<i>long terminal repeat</i>
miRNA	microRNA
MVB	corpo multivesicular
NF- κ B	fator nuclear kappa B
nm	nanômetros
NRP-1	neurofilina-1
pb	pares de base
PBMC	células mononucleares do sangue periférico
PBS	tampão de salina fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
PVDF	polifluoreto de vinilideno
r^2	coeficiente de correlação
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
NTA	análise de rastreamento de nanopartículas
PEG	polietilenoglicol
SNC	sistema nervoso central
tax	gene regulador de transativação do HTLV-1
Tax	fosfoproteína transativadora do HTLV-1
TBS-T	tampão tris-salino Tween
TCD4 ⁺	linfócito T auxiliar
TCD8 ⁺	linfócito T citotóxico
TNF- α	fator de necrose tumoral-alfa
URE	unidade relativa de expressão
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
κ	Kappa
®	Marca registrada
™	Trademark

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas.....	v
Lista de símbolos.....	vii
1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Casuística.....	26
3.1.1 Aspectos Éticos	27
3.2 Isolamento dos exossomos	27
3.2.1 Preparo das amostras	27
3.2.2 Precipitação polimérica	27
3.3 Caracterização dos exossomos	27
3.3.1 <i>Western Blot</i>	27
3.3.2 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)	28
3.4 Análise da expressão gênica	28
3.4.1 Extração de RNA.....	28
3.4.2 Análise do RNA exossomal.....	29
3.4.3 Transcrição reversa (RT-PCR)	29
3.4.4 PCR quantitativa.....	29
3.5 Cálculo da quantificação relativa.....	30
3.6 Carga proviral.....	30
3.6.1 Extração de DNA.....	30
3.6.2 Construção do vetor para quantificação da CPV.....	31

3.6.3	Isolamento dos fragmentos <i>pol</i> e β -globina para construção do vetor plasmidial Topo HTLV+ β -globina	34
3.6.4	Construção da curva-padrão	36
3.6.5	Quantificação absoluta da carga proviral	36
3.7	Análises estatísticas	37
4	RESULTADOS	39
4.1	Caracterização dos indivíduos infectados pelo HTLV-1	39
4.2	Comparação dos métodos de isolamento dos exossomos: Ultracentrifugação versus precipitação polimérica	39
4.3	Caracterização dos exossomos	40
4.3.1	Detecção dos marcadores exossomais por <i>Western Blot</i>	40
4.3.2	Avaliação do tamanho e concentração por <i>NTA</i>	41
4.4	Análise do perfil de RNA exossomal	42
4.5	Quantificação relativa de <i>tax</i> e <i>HBZ</i>	43
4.6	Carga proviral do HTLV-1	45
4.6.1	Construção da Curva-Padrão	45
4.7	Quantificação da Carga Proviral	48
4.8	Análise da relação da CPV com os genes virais <i>tax</i> e <i>HBZ</i>	50
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÕES	61
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
	APÊNDICES	72
	ANEXOS	79

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)

1.1.1 Aspectos gerais

O HTLV pertence à família *Retroviridae*, à subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus*, e possui duas fitas de RNA cuja polaridade é positiva. São descritos quatro tipos virais: HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4. O HTLV-1 foi o primeiro retrovírus humano descrito associado a uma doença, a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) (POIESZ et al., 1980) e, posteriormente, à mielopatia associada ao HTLV/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (GESSAIN et al., 1985). Em relação ao HTLV-2, (KALYANARAMAN et al., 1982) seu potencial como agente causal de doenças ainda não é totalmente esclarecido. E a possibilidade de transmissão dos HTLV-3 e HTLV-4 ao homem e a capacidade de causar doenças são também desconhecidas (WOLFE et al., 2005).

Os dados epidemiológicos mundiais estimam que cerca de 5 a 10 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 (COOK et al., 2016). As regiões que abrangem o sudoeste do Japão, África Subsaariana, Caribe e América do Sul são consideradas áreas endêmicas para o vírus (GESSAIN; CASSAR, 2012). A infecção é relatada em todos os países sul-americanos, com maior prevalência na Argentina, Brasil, Colômbia e Peru (VRIELINK; REESINK, 2004). Estima-se que o Brasil seja o país com maior número absoluto de indivíduos infectados no mundo totalizando 2,5 milhões de casos soropositivos (CARNEIRO-PROIETTI AB, CATALAN-SOARES B, 2002; GOTUZZO E, ARANGO C, DE QUEIROZ-CAMPOS A, 2000).

1.1.2 Estrutura genômica

O HTLV-1 pertence à família dos retrovírus, uma família de vírus que replica o RNA viral por meio de um processo denominado transcrição reversa, pelo qual as moléculas de DNA fita dupla são geradas a partir da fita simples de RNA (GOOF, 2001). O DNA proviral do HTLV-1 possui 9.032 pb e apresenta os genes estruturais *gag*, *pol* e *env* (responsáveis pela síntese de proteínas da estrutura do vírus), além da região pX que contém os genes regulatórios *tax*, *rex* e *HBZ* (essenciais para a regulação da expressão de genes virais). As extremidades do genoma são flanqueadas por duas regiões LTR (do inglês, *long terminal repeats*), cujas sequências são essenciais na integração do provírus no DNA da célula hospedeira (SEIKI et al., 1983).

1.1.4 Doenças associadas ao HTLV-1

A ATL foi a primeira doença humana associada ao HTLV-1. Trata-se de uma doença maligna de linfócitos T que acomete cerca de 5% dos indivíduos infectados e pode ser classificada em quatro subtipos de acordo com as manifestações clínicas: indolente, crônica, aguda e linfomatosa (COOK et al., 2014). Os linfócitos T CD4⁺ infectados expressam a proteína viral Tax responsável pela ativação de genes virais e transformação maligna dos linfócitos T a partir da ativação de fatores de transcrição celulares, incluindo o E2F (LEMASSON et al., 1998), fator nuclear kappa B (NF-κB) (XIAO et al., 2001) e proteína ativadora 1 (AP-1) (IWAI et al., 2001), além da inativação do gene supressor tumoral p53 (SUZUKI; UCHIDA-TOITA; YOSHIDA, 1999). A proteína fator de zíper de leucina básico do HTLV-1 (HBZ, do inglês *HTLV-1 basic leucine zipper factor*) atua como um inibidor da transativação mediada por Tax através da formação de heterodímeros com o fator transcricional CREB2, conhecido por ativar a transcrição do HTLV-1. Além disso, HBZ forma heterodímeros com Jun, ativando a expressão de genes celulares (BASBOUS et al., 2003; THÉBAULT et al., 2004).

Outra doença associada ao HTLV-1 é a HAM/TSP, uma doença neuroinflamatória degenerativa de caráter progressivo cujas principais manifestações neurológicas são espasticidade e/ou hiperreflexia de extremidades inferiores, bexiga neurogênica, fraqueza muscular dos membros inferiores e distúrbios sensoriais com dor lombar. Nesta doença, ocorre um desarranjo imunológico no sistema nervoso central (SNC) gerado pela atividade de Tax. Nas células infectadas, essa proteína estimula a secreção de citocinas e quimiocinas inflamatórias como interferon-gama (IFN-γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α) e interleucina-6 (IL-6), responsáveis pelo dano ao tecido. Além disso, Tax induz a expressão de moléculas de adesão que facilitam a invasão do SNC pelas células infectadas do sistema imunológico, como linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (FUZII et al., 2014; NAGAI; OSAME, 2003). Na HAM/TSP, a expressão do gene HBZ está correlacionada positivamente com marcadores inflamatórios, carga proviral (CPV) e disfunção motora, sugerindo o seu uso para o monitoramento da progressão da doença (SAITO et al., 2009).

Contudo, a maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática, enquanto apenas 1 a 4% desenvolvem esta doença. O mecanismo pelo qual a maioria dos indivíduos infectados permanece sem sintomatologia específica para HAM/TSP ainda é desconhecido. Entretanto, diversos trabalhos demonstram fatores associados ao desenvolvimento desta doença, tais como elevada CPV (IWANAGA et al., 2010; NAGAI; OSAME, 2003), fatores

associados ao hospedeiro, tais como características genéticas, polimorfismos de genes reguladores de citocinas (IL-18 e IFN- γ) (ROCHA-JÚNIOR et al., 2012), e características imunológicas do hospedeiro, como o aumento na expressão de genes virais e de citocinas inflamatórias (TATTERMUSCH et al., 2012).

O aumento da CPV é considerado um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1. Assim, a quantificação da CPV é muito utilizada na clínica como fator prognóstico destas doenças. No entanto, o que se observa é que há divergência, em alguns casos, de valores de CPV e doença, nos quais pacientes com HAM/TSP apresentam baixa CPV, bem como alguns portadores assintomáticos, elevada CPV (COOK et al., 2013). Dessa forma, apesar de ser um bom preditivo na maioria dos casos, a CPV não é capaz de fornecer um prognóstico 100% confiável.

1.1.5 Mecanismos moleculares de transmissão do HTLV-1

O HTLV-1 infecta principalmente os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e a sua transmissão entre os indivíduos ocorre pela transferência dessas células infectadas no leite materno, sêmen, ou sangue. Assim, a transmissão do HTLV-1, ao contrário do vírus HIV, requer o contato célula-célula e a infecção por vírus livres é aparentemente ineficaz (DONEGAN et al., 1994; MAZUROV et al., 2010).

Para a entrada do vírus na célula-alvo, é necessária a interação da glicoproteína do envelope viral (Env) com três tipos de receptores presentes na célula-alvo: heparan sulfato-proteoglicano (HSPG), neurofilina-1 (NRP-1) e o transportador de glicose 1 (GLUT-1), sendo que os dois primeiros são responsáveis pela ligação inicial (GHEZ et al., 2006) e o último permite a entrada do vírus na célula.

Em relação à transmissão célula-célula do HTLV-1, os três mecanismos mais conhecidos são: biofilme viral, sinapse viral e conduítes celulares. Dentre eles, a principal rota de transmissão viral de uma célula para outra é pela formação de biofilme viral, o qual é composto por carboidratos, componentes da matriz extracelular (colágeno, agrina), proteínas ligantes (galectina-3, tehterina) e receptores de superfície (CD43, CD45). O processo de transmissão ocorre quando os vírions se acumulam na superfície das células infectadas, permitindo a passagem dessas partículas virais para as células-alvo na periferia do contato celular, e consequentemente, impedindo o reconhecimento do vírus pelo sistema imunológico (GROSS; THOMA-KRESS, 2016; PAIS-CORREIA et al., 2010)

No mecanismo de sinapse viral, Tax induz a polarização do centro de organização do microtúbulo (MTOC) e o aumento da expressão da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) na superfície das células infectadas pelo HTLV-1. A interação entre ICAM-1 e LFA-1 (antígeno associado à função do linfócito, expresso na célula-alvo) permite a transmissão do vírus para uma célula não infectada por uma fenda sináptica (NEJMEDDINE et al., 2009).

Outra forma de transmissão célula-célula do HTLV-1 ocorre entre células distantes pela formação de conduítes celulares, nos quais a proteína p8, resultante da clivagem da p12 viral, atua na formação de polissinapses e no aumento do comprimento e número de conduítes (PROOYEN et al., 2010).

Além dos mecanismos mais conhecidos (biofilme viral, sinapse viral e conduítes celulares), novas rotas de transmissão do HTLV-1 foram descritas. Estudos *in vitro* demonstraram que esse retrovírus é capaz de infectar as células dendríticas a fim de facilitar a disseminação viral para os linfócitos T CD4⁺ nos estágios iniciais da infecção (JONES et al., 2008). Nesse sentido, são conhecidos dois mecanismos distintos: trans-infecção (quando as células dendríticas capturam os vírions e os transferem para as células-alvo) ou cis-infecção (quando as células dendríticas são infectadas antes da transmissão viral) (GROSS; THOMAS-KRESS, 2016). No entanto, sabe-se que apesar do HTLV-1 infectar a maioria dos tipos celulares *in vitro*, é relatado que a CPV *in vivo* está localizada principalmente nos linfócitos T CD4⁺, seguido de linfócitos T CD8⁺ e, raramente, em células dendríticas (BANGHAM et al., 2015).

Além disso, devido ao importante papel na comunicação intercelular, um tipo de vesícula extracelular definida como exossomo foi recentemente relacionada como outro possível mecanismo de transmissão do HTLV-1 (JAWORSKI et al., 2014). A possibilidade da transferência do conteúdo viral por essas vesículas, na ausência de vírus, para células não infectadas é considerada um mecanismo intrigante.

1.2 Vesículas extracelulares

Foi demonstrado que exossomos derivados de células infectadas por diferentes tipos de vírus, como HIV (DE CARVALHO et al., 2014; LENASSI et al., 2010), HCV (RAMAKRISHNAIAH et al., 2013) e HTLV-1 (JAWORSKI et al., 2014) contêm componentes virais incluindo proteínas, RNAm e miRNA capazes de modular a resposta da célula hospedeira e induzir uma infecção viral.

Um estudo realizado *in vitro* demonstrou que exossomos secretados a partir de células infectadas pelo HTLV-1 foram capazes de incorporar a proteína viral Tax, bem como transcritos de RNAm de *tax*, *HBZ*, além de mediadores proinflamatórios. Tal achado sugere que tais vesículas podem servir como veículos de entrega desses componentes virais para as células receptoras e dessa forma, contribuir para a patogênese da doença (JAWORSKI et al., 2014).

1.2.1 Biogênese

As vesículas extracelulares são liberadas por diferentes tipos celulares e são classificadas de acordo com a sua biogênese e tamanho em corpos apoptóticos, microvesículas e exossomos (GANGODA et al., 2014). Os corpos apoptóticos são vesículas de 1 a 5 µm liberadas durante a morte celular programada. As microvesículas são vesículas formadas diretamente do brotamento da membrana plasmática e possuem de 100 a 1.000 nm. Já os exossomos, com apenas 30 a 150 nm, possuem origem endocítica e são secretados a partir da fusão de corpos multivesiculares com a membrana plasmática (SIMONS; RAPOSO, 2009; THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009)(RAPOSO; STOORVOGEL, 2013) (Figura 1).

A biogênese dos exossomos inicia-se pelo processo de invaginação da membrana celular durante a internalização de ligantes extracelulares ou componentes celulares. Os endossomos precoces gerados acumulam vesículas intraluminais (ILV) em seu interior e são referidos como corpos multivesiculares (MVB, do inglês *multivesicular bodies*) (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). Esses MVB podem fundir-se com os lisossomos e sofrer degradação, ou ainda com a superfície celular, liberando as ILV para o exterior, agora denominadas como exossomos (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

Figura 1. A biogênese dos exossomos. A biogênese do exossomo inicia com a invaginação da membrana citoplasmática, mediada pela proteína clatrina (pontos em vermelho), formando o endossomo. Após a invaginação da membrana endossomal, ocorre o acúmulo de vesículas no lúmen (vesículas intraluminais), que originam os corpos multivesiculares (MVB). Estes, por sua vez, são degradados nos lisossomos ou se fundem com a membrana plasmática, liberando os exossomos (modificado de RAPOSO; STOORVOGEL, 2013).

Vários estudos demonstraram a liberação de exossomos a partir de diferentes tipos de células (SIMONS; RAPOSO, 2009; THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009) e a sua detecção em diferentes fluidos como saliva, sangue, leite (LÄSSER et al., 2011), urina (PISITKUN; SHEN; KNEPPER, 2004), fluido broncoalveolar (ADMYRE et al., 2003), sêmen (MADISON; ROLLER; OKEOMA, 2014), fluido cerebrospinal (PEGTEL; PEFEROEN; AMOR, 2014), dentre outros.

A composição específica de cada subtipo de vesícula extracelular é desconhecida, mas sabe-se que os exossomos possuem material oriundo do citoplasma e da membrana da célula de origem, incluindo proteínas, lipídeos e RNA (RNA mensageiro, microRNA) (VALADI et al., 2007).

1.2.2 Métodos de isolamento

Devido à detecção em fluidos biológicos e à capacidade de carrear componentes moleculares, vesículas extracelulares como exossomos representam potenciais biomarcadores no diagnóstico e prognóstico de doenças tais como câncer e doenças infecciosas (LOBB et al., 2015). Nesse contexto, é crescente o interesse de estudos que envolvam vesículas e fluidos biológicos, como já relatado.

Uma variedade de técnicas foi descrita para o isolamento de exossomos, incluindo a precipitação polimérica (CARADEC et al., 2014; REKKER et al., 2014) e a ultracentrifugação (CABY et al., 2005). No entanto, sabe-se que diferentes métodos de

purificação podem ser necessários para um isolamento eficaz a partir de diferentes fontes: sobrenadante de cultura celular ou fluidos biológicos tais como o soro, plasma, urina, leite e fluido cérebro-espinhal (WITWER et al., 2013). Em um estudo para o isolamento de exossomos a partir do soro, por exemplo, foi relatado que a precipitação polimérica foi superior à ultracentrifugação (CARADEC et al., 2014). No entanto, a literatura é bastante divergente e existe falta de padronização em relação aos métodos de isolamento de exossomos a partir do soro. Dessa forma, o estudo de exossomos a partir desse fluido biológico é considerado um desafio.

A ultracentrifugação permite a separação de pequenas vesículas extracelulares, à elevada velocidade ($100.000 - 120.000 \times g$). No entanto, o *pellet* também pode conter agregados proteicos e outros contaminantes. Além disso, diversas variáveis estão envolvidas nesse isolamento como a habilidade do operador, tempo de rotação e tipos de rotores utilizados (WITWER et al., 2013).

Já a precipitação polimérica é um método rápido que envolve a captura de exossomos (60 - 150 nm) em redes de polímero como o polietilenoglicol (PEG), utilizando uma centrifugação à baixa velocidade ($1.500 \times g$). O polímero é inerte e, desta forma, não interfere nas análises de RNA e proteína, e ainda mantém os exossomos na sua forma bioativa para a realização de estudos funcionais. No entanto, dependendo da amostra, pode ocorrer a formação de agregados proteicos (PETERSON et al., 2015).

Dessa forma, um consenso na literatura envolve etapas iniciais de centrifugação diferencial a $300 \times g$ por 10 minutos, $2.000 \times g$ por 10 minutos e $10.000 \times g$ por 30 minutos para a remoção de células, células mortas e debris celulares, respectivamente. O uso do filtro 0,2 μm pode ser utilizado quando se deseja isolar pequenas vesículas extracelulares (THÉRY et al., 2006).

1.2.3 Métodos de caracterização

Em relação à caracterização dos exossomos, a Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV, do inglês *International Society for Extracellular Vesicles*) preconiza a avaliação de alguns parâmetros nessas vesículas, tais como tamanho, identificação de alguns tipos de proteínas, bem como avaliação da morfologia. Para a identificação de proteínas transmembrana como, por exemplo, as tetraspaninas (CD9, CD63 e CD81) é recomendada a utilização das técnicas de *Western Blot*, citometria de fluxo ou espectrometria de massas. As proteínas citosólicas como TSG101, ANXA e RAB também podem ser detectadas. Além

disso, pode ser demonstrada a ausência de proteínas intracelulares provenientes do retículo endoplasmático (HSP90B1, CANX), Golgi (GM130), mitocôndria (CYC1), núcleo (HISTH) ou complexo Argonauta/ RISC (AGO) (LÖTVALL et al., 2014).

Para análise quanto ao indicador de heterogeneidade das vesículas são indicadas as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (fornecendo uma evidência direta das estruturas vesiculares) e a análise da distribuição de tamanho, que pode ser realizada por técnicas como análise de rastreamento de nanopartículas (NTA, do inglês *nanoparticle tracking analysis*) ou dispersão de luz dinâmica (DLS, do inglês *dynamic light scattering*) (LÖTVALL et al., 2014).

Ao contrário do DLS, que permite análise apenas do tamanho das vesículas extracelulares, o NTA permite uma análise da concentração (partículas/mL) e distribuição de tamanho (faixa de nm) das vesículas extracelulares. Nesse método, as partículas em suspensão líquida são iluminadas por um feixe de laser e a luz emitida por cada partícula é capturada por um microscópio acoplado a uma câmera. A partir do vídeo gerado, o *software* NTA calcula a velocidade média de cada partícula pela equação de *Stokes-Einstein* com base no movimento browniano. Sabendo que a velocidade de uma partícula é inversamente proporcional ao seu tamanho, o software fornece este dado ao final da análise. Além disso, pelo vídeo capturado, é possível a contagem de cada partícula, e dessa forma, ao final da análise, obtém-se a concentração de exossomos da amostra (DRAGOVIC et al., 2011).

1.2.4 Funções

A liberação de vesículas extracelulares é um processo conservado entre todas as formas de vida incluindo bactérias (SJOSTROM et al., 2015), *archaea*, fungos e parasitas (DEATHERAGEA; COOKSONA, 2012) e pode desempenhar diferentes funções tanto na fisiologia quanto na patogênese celular (IRACI et al., 2016).

Devido à transferência de biomoléculas ativas, os exossomos possuem um importante papel na comunicação intercelular, com contribuição no desenvolvimento do sistema nervoso (KORKUT et al., 2009), resposta imunológica (ROBBINS; MORELLI, 2014), comunicação neuronal (FRÜHBEIS et al., 2013), reparo tecidual, e entre outros (LAI et al., 2010).

Um estudo pioneiro realizado por Raposo e cols. demonstrou que exossomos liberados por células B humanas e murinas foram capazes de ativar a resposta imunológica das células T pelo transporte do complexo antígeno-MHC de classe II. Tal evidência sugere o papel dessas vesículas como apresentadoras de antígenos (RAPOSO et al., 1996). A ativação dos

linfócitos T também foi observada posteriormente, envolvendo exossomos liberados de outros tipos celulares, como células dendríticas (VINCENT-SCHNEIDER et al., 2002). Adicionalmente, sabe-se que essas vesículas carregam antígenos tumorais para as células apresentadoras de antígenos (APC, do inglês *Antigen Presenting Cell*) que, por sua vez, ativam linfócitos T citotóxicos específicos para o tumor. Dessa forma, exossomos contendo antígenos tumorais podem ser utilizados na ativação das células T e considerados para a abordagem terapêutica contra o câncer (ROBBINS; MORELLI, 2014).

Além disso, foi relatado que os exossomos podem ser uma alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias no cérebro através da entrega de drogas antiinflamatórias tais como curcumina e JSI-124 (ZHUANG et al., 2011).

Os exossomos também já foram associados ao desenvolvimento de desordens patológicas, como câncer e infecções virais (BAIXAULI; LÓPEZ-OTÍN; MITTELBRUNN, 2014). Em relação ao câncer, sabe-se que os exossomos derivados de células tumorais estimulam a metástase por diferentes mecanismos, tais como indução da disseminação de células tumorais por alterações na polaridade celular e matriz extracelular, e da neoangiogênese por citocinas e fatores de crescimento (PANT; HILTON; BURCZYNSKI, 2012). Ainda foi demonstrado que os exossomos contribuem para a progressão de outras doenças neurodegenerativas através da transmissão de proteínas patogênicas às células vizinhas, tais como α -sinucleína envolvida na doença de Parkinson, bem como a proteína precursora da amiloide (APP, do inglês *Amyloid Precursor Protein*) e a Tau fosforilada envolvidas na doença de Alzheimer. Outros autores sugerem que os miRNA podem contribuir para o dano no SNC (PEGTEL; PEFFEROEN; AMOR, 2014). Ademais, doenças neurodegenerativas apresentam falha no processo de autofagia, aumentando a secreção de proteínas tóxicas cujos exossomos facilitam a disseminação do vírus (BAIXAULI; LÓPEZ-OTÍN; MITTELBRUNN, 2014).

1.3 Exossomos e infecções virais

Vários estudos relatam o envolvimento dos exossomos nas infecções virais, dentre elas as infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), vírus Epstein-Barr (EBV) e vírus da hepatite C (HCV). A resposta imunológica desencadeada pelos exossomos pode conferir tanto uma susceptibilidade do hospedeiro à infecção quanto uma resistência ao patógeno em questão (WURDINGER et al., 2012). Os exossomos transferem proteínas, RNAm/miRNA e outros componentes citosólicos e alteram a expressão de várias moléculas na célula-alvo e,

dessa forma, tanto podem ativar como regular células do sistema imunológico (FLEMING et al., 2014).

As vesículas extracelulares provenientes de células infectadas pelo HIV liberam a proteína viral Nef, que induz a apoptose de linfócitos T CD4⁺ e contribui para a patogênese do vírus, além de expressarem correceptores que facilitam a entrada do vírus na célula. Contudo, exossomos derivados de linfócitos T CD8⁺ contêm a citidinadeaminase APOBEC3G, componente que atua contra este retrovírus, além de moléculas como CD45, CD86 e MHC classe II que atuam suprimindo a replicação viral (LENASSI et al., 2010).

Outro vírus, o EBV, possui a capacidade de evasão do sistema imunológico pela liberação de exossomos contendo miRNAs que inibem a proliferação de linfócitos T e promovem a destruição ou inativação destas células, colaborando para a infecção viral. Além disso, os exossomos produzidos por estas células infectadas contêm proteínas virais, como a proteína latente (LMP1, do inglês *latent membrane protein*), que contribuem para a proliferação celular por meio do aumento de proteínas anti-apoptóticas (MECKES; RAAB-TRAUB, 2011).

Em relação ao HCV, os exossomos transferem RNA das células infectadas para as células dendríticas plasmocitoides, sendo assim, responsáveis tanto pelo aumento da infectividade viral quanto pela indução da resposta imunológica inata. A ativação dessa resposta ocorre pela expressão de genes que estimulam a secreção de IFNs do tipo I que bloqueiam o ciclo de vida viral (DREUX et al., 2012).

Dessa forma, os efeitos dos exossomos variam de acordo com o tipo da célula infectada, o tipo viral e fase do ciclo de vida, podendo atuar tanto na propagação viral quanto na imunidade antiviral, modulando a resposta imune contra o vírus (MAHMOODZADEH HOSSEINI et al., 2013).

1.3.1 Exossomos na infecção pelo HTLV-1

Para entender o papel dos exossomos na infecção pelo HTLV-1, Jaworski e cols. cultivaram diferentes linhagens infectadas por esse retrovírus. Após cinco dias de cultivo, as nanovesículas foram isoladas do sobrenadante de cultura por ultracentrifugação (100.000 × g por 70 minutos). As análises por *Western Blot* e microscopia eletrônica de transmissão revelaram que os exossomos apresentaram marcadores, tamanho e morfologia característicos. Os mesmos foram avaliados quanto ao conteúdo viral. Dessa forma, foram detectados a proteína Tax e alguns mediadores inflamatórios, bem como transcritos de RNAm para *env*,

tax e *HBZ*. Tais achados sugerem a possível contribuição dessas vesículas para a patogênese da infecção pelo HTLV-1 e progressão das doenças associadas (JAWORSKI et al., 2014).

Uma análise realizada *in vivo* por espectrometria de massas revelou que exossomos isolados do soro de pacientes infectados pelo HTLV-1 apresentaram diferentes níveis de expressão protéica entre os grupos clínicos HAC, HAM/TSP e ATL. As proteínas Tax e HBZ não foram detectadas em portadores assintomáticos, porém estavam expressas na HAM/TSP, com elevada expressão em ATL (DUTTA et al., 2015).

Anderson e cols. também foram capazes de detectar a proteína Tax em exossomos isolados do líquido cefalorraquidiano de indivíduos sintomáticos para o HTLV-1 (HAM/TSP) (ANDERSON et al., 2015). Além disso, sabe-se que essas vesículas são importantes para a apresentação de antígenos do HTLV-1 via MHC associados em sua superfície, colaborando para a resposta neuroinflamatória na HAM/TSP (YAMANO; SATO, 2012).

Apesar da literatura abordar evidências de que várias células infectadas por vírus podem produzir exossomos que participam de mecanismos de disseminação viral, os estudos que relatam o papel dos exossomos na infecção pelo HTLV-1 *in vivo* são escassos e apenas um estudo relata a função dos exossomos *in vitro*. Dessa forma, a função dos mesmos na patogênese da HAM/TSP ainda não é bem compreendida e mais estudos são necessários para confirmar a contribuição dos exossomos para a progressão da doença em indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Os estudos relacionados ao entendimento da patogênese das doenças associadas ao HTLV-1 são fundamentais, uma vez que estas doenças não possuem cura, tratamento eficaz e vacina. Outro aspecto importante para esta abordagem é a severidade clínica dos indivíduos acometidos por HAM/TSP e ATL, que podem levar à perda total dos movimentos de membros inferiores e à leucemia com sobrevida de dois anos, respectivamente.

As características celulares, genéticas e imunológicas do hospedeiro são fatores importantes que levam os indivíduos infectados pelo HTLV-1 a permanecer no quadro assintomático ou desenvolver as doenças associadas. No entanto, tais mecanismos não foram totalmente elucidados e novas abordagens de estudos são necessárias para a compreensão da patogênese viral. Neste sentido, os estudos relacionados aos exossomos e o seu papel na infecção pelo HTLV-1 tornam-se relevantes.

Como os exossomos estão envolvidos no desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas, tais vesículas também podem estar associadas ao desenvolvimento de HAM/TSP. Portanto, a detecção de conteúdo viral nestas vesículas provenientes do soro de

indivíduos infectados pelo HTLV-1 poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos de patogênese envolvidos no desenvolvimento da HAM/TSP, bem como no diagnóstico/prognóstico da doença.

2 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Isolar, caracterizar os exossomos do soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e comparar o conteúdo dessas vesículas quanto à expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* entre os grupos assintomáticos e sintomáticos para o HTLV-1.

4.2 Objetivos Específicos

- Comparar os métodos de precipitação polimérica e ultracentrifugação para o isolamento de exossomos e isolar os exossomos do soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (assintomáticos e sintomáticos) e de grupo controle saudável;
- Caracterizar os exossomos quanto à detecção de proteínas enriquecidas nos mesmos, tamanho e concentração;
- Analisar a expressão de *tax* e *HBZ* nos exossomos;
- Quantificar e comparar a carga proviral entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1, sintomáticos e assintomáticos;
- Correlacionar a expressão de *tax* e *HBZ* com a CPV.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 2. Delineamento da estratégia experimental.

3.1 Casuística

Foram estudadas 18 amostras de sangue total de indivíduos infectados e controles, distribuídas em: i) seis amostras de soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1 diagnosticados com HAM/TSP, ii) seis amostras de soro de portadores do HTLV-1 assintomáticos (HAC), e iii) seis amostras de indivíduos sadios (grupo controle-CT).

As amostras dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 (HAC e HAM/TSP) foram provenientes do Ambulatório de Neurologia Tropical do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Esses indivíduos foram avaliados pelo corpo clínico e caracterizados como assintomáticos ou sintomáticos de acordo com a ausência ou presença de manifestações clínicas associadas ao HTLV-1. As coletas do grupo controle foram realizadas a partir de indivíduos sadios, não portadores de doenças infecciosas. As amostras foram obtidas a partir de voluntários da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

Como critério de inclusão neste estudo, foi considerada a positividade para os testes de sorologia e reação em cadeia da polimerase (PCR) específica para o HTLV-1. Foram excluídos os indivíduos com sorologia positiva para outras doenças infecciosas, como HIV, HBV e HCV.

3.1.1 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP, sob o número de processo 3437/2015 (Anexo I). Todos os indivíduos foram informados quanto ao procedimento de coleta e as amostras foram utilizadas somente mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos II e III).

3.2 Isolamento dos exossomos

3.2.1 Preparo das amostras

O soro obtido a partir das amostras de sangue total foi submetido à centrifugação a $1.455 \times g$ durante 10 minutos. Em seguida, foram realizadas algumas etapas de centrifugação diferencial para remoção de contaminantes: $300 \times g$ por 10 minutos (para a remoção de células), $2.000 \times g$ por 10 minutos (para a remoção de células mortas) e $10.000 \times g$ por 30 minutos (para a remoção de debris celulares). Posteriormente, foi realizada uma filtração a $0,22 \mu m$ e as amostras foram congeladas a $-80^\circ C$ até o momento do uso.

3.2.2 Precipitação polimérica

A fração exossomal do soro foi isolada pela técnica de precipitação polimérica utilizando o reagente ExoQuick™ (*System Biosciences*). Para o isolamento, 1/4 do reagente contendo polietilenoglicol (PEG) foi adicionado às amostras seguido de incubação a $4^\circ C$ *overnight*. Após duas etapas de centrifugação ($1.500 \times g$ por 30 minutos e 5 minutos), o *pellet* foi eluído com PBS em 1/10 do volume original de soro.

3.3 Caracterização dos exossomos

Para a caracterização dos exossomos, foram utilizadas as técnicas de *Western Blot*, microscopia eletrônica de transmissão e Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA, do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis*).

3.3.1 Western Blot

Para a extração das proteínas totais, os exossomos purificados do soro foram lisados em $200 \mu L$ de tampão RIPA (Life Sciences) contendo inibidores de protease e fosfatase (Roche), seguido de sonicação e centrifugação a $20.000 \times g$ por 30 minutos. A concentração proteica do sobrenadante foi determinada por BCA (Thermo Scientific) utilizando o espectrofotômetro *Soft Max Plus*. A seguir, $60 \mu g$ de proteínas solubilizadas em *Buffer NuPAGE® LDS* (Life Technologies) foram aplicadas em gel de poliacrilamida SDS Tris-glicina 12 %. A linhagem

celular infectada pelo HTLV-1, MT-2 (número de catálogo 88051601, ECACC), foi utilizada como controle para a expressão de proteínas virais.

Após eletroforese, corrida sob voltagem de 80 V nos primeiros 30 minutos seguido de 100 V (até a queda do azul de bromofenol do gel), as proteínas foram transferidas à 35 A para a membrana de PVDF Hybond- P (GE Healthcare), ativada em metanol por um período de 1 hora. A membrana foi bloqueada (leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-T e 0,01% de azida sódica) durante 2 horas seguido de incubação com os anticorpos primários anti-CD9 (1:1.000), anti-CD81 (1:500), anti-Alix (1:400) e anti-citocromo c (1:400).

Os anticorpos secundários anti-mouse (GE Healthcare) na diluição 1: 2.000 e anti-goat IgG-HRP na diluição 1: 500 (Santa Cruz Biotechnology) foram adicionados e o complexo foi visualizado pelo aumento da quimioiluminescência utilizando o *Kit Amersham ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

3.3.2 Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA)

A concentração e a distribuição de tamanho das partículas de cada amostra foram medidas com NTA (NS300; Nanosight, Malvern), equipado com uma câmera sCMOS e NanoSight NTA *software* v3.1. Os vídeos foram adquiridos com uma câmera nível 11. Foi utilizada uma temperatura de 37° C e *beads* de calibração de 100 nm (Malvern) para checar se o tamanho estava preciso. As amostras foram introduzidas manualmente e cinco vídeos de 30 segundos foram registrados por amostra. As amostras biológicas foram diluídas em PBS para manter o número de leituras válidas entre 500 - 2.000 por vídeo. A concentração das vesículas foi definida como uma média das concentrações determinadas por cada um dos cinco vídeos, analisados com um *threshold* de detecção de 3. O *blur* (projetado para eliminar o ruído), a faixa de comprimento mínimo e tamanho mínimo de partícula esperado foram definidos automaticamente pelo *software*.

3.4 Análise da expressão gênica

3.4.1 Extração de RNA

Após o isolamento dos exossomos por ExoQuickTM (System Biosciences), o RNA foi extraído por Trizol® (Thermo Fisher Scientific), e em seguida, foi utilizado o kit QIAmp Viral RNA (Qiagen), metodologia baseada na combinação fenol e coluna. Para isso, 500 µL de Trizol, 10 µL de glicogênio e 100 µL de clorofórmio foram adicionados ao *pellet* de exossomos, e a seguir, a mistura foi homogeneizada em vórtex. Após centrifugação a 12.000 × g por 5 minutos a 4° C, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo. A seguir, a mesma

foi utilizada para extração do RNA com o Kit QIAmp Viral RNA, conforme instruções do fabricante. O RNA foi eluído em 30 µL de água *nuclease-free* e armazenado à -80° C até o processamento.

3.4.2 Análise do RNA exossomal

O RNA extraído foi quantificado e avaliado por eletroforese capilar (*Agilent2100 Bioanalyzer*). Para isso, 1 µL de RNA foi analisado com o *Agilent RNA 6000 Nano Kit* (Agilent Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. Os eletroferogramas foram visualizados utilizando o *Agilent 2100 Expert software* (Agilent technologies). A seguir, o perfil do RNA exossomal foi analisado quanto ao tamanho e comparado com o RNA celular da linhagem MT-2.

3.4.3 Transcrição reversa (RT-PCR)

A seguir, o RNA total foi transcrito em cDNA com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), utilizando *primers reverse* específicos para cada reação (Tabela 1). Para um volume de 20 µL, foram utilizados 2 µL de Buffer RT 10 X, 0,8 µL de dNTP Mix 25X (100 mM), 4 µL de primer reverso específico (5 µM), 1µL de Transcriptase Reversa *MultiScribe™*, 2 µg de RNA e água *nuclease-free* para ajuste do volume final. A reação foi incubada no termociclador à 25°C por 10 minutos e 37°C por 120 minutos.

Tabela 1. Sequência de *primers reverse* para a região *tax* e *HBZ* do genoma viral e *ACTB*.

Gene	Primers	Sequência (5'-3')
<i>Tax</i>	R	GAGAAACTTACCCATGGTGTGTTGG
<i>HBZ</i>	R	GAGCCGATAACGCGTCCAT
<i>ACTB</i>	R	CCAGGGCAGTGATCTCCTTCT

R: *primer anti-sense*.

ACTB: β-actina

3.4.4 PCR quantitativa

A fim de quantificar a expressão dos genes *tax* e *hbz*, foi realizada PCR em tempo real. A sequência dos primers utilizados está representada na Tabela 2. Para cada reação de 25 µL, foram utilizados 12,5 µL de *Taqman®Universal PCR Master Mix* (2X), 1,5 µL de *primer* específico *forward* e *reverse* (5 µM), 0,75 µL de sonda gene-específica marcada com FAM (20X), 5 µL de cDNA e água *nuclease-free*.

Para a reação da β -actina (ACTB), gene de referência, foram utilizados 10 μ L de Taqman®Universal PCR Master Mix (2X), 1 μ L de sonda gene-específica marcada com VIC/TAMRA (20X), 4 μ L de cDNA e água nuclease-free para um volume final de 20 μ L.

Tabela 2. Sequência de *primers* e sondas para a região *tax* e para a região *HBZ* do genoma viral utilizados para a PCR quantitativa.

Gene	Primers	Seqüência (5'-3')
Tax	F	ATCCCGTGGAGACTCCTCAA
	R	GAGAACTTACCCATGGTGTG
	Sonda	FAM-AGCTGCATGCCCAAGA-MGB
HBZ	F	TACATCGTCACGCCCTACTGG
	R	GAGCCGATAACGCGTCCAT
	Sonda	FAM-ATCAGATCACCTGGGACC-MGB

F: *primer sense*. R: *primer anti-sense*.

3.5 Cálculo da quantificação relativa

Os resultados da expressão gênica de *tax* e *HBZ* obtidos foram expressos em Unidade Relativa de Expressão (URE), de acordo com o cálculo a seguir:

$$\Delta Ct = Ct \text{ do gene alvo} - \text{média geométrica dos Cts do gene de referência}$$

$$URE = 10000 / 2^{\Delta Ct}$$

3.6 Carga proviral

3.6.1 Extração de DNA

O sangue total foi coletado em tubos contendo EDTA (EDTA Vacuette Greiner Bio-one). A partir do *buffy-coat*, foi realizada a extração de DNA genômico através do kit *Gentra Puregene Blood* (Qiagen).

As amostras de sangue foram centrifugadas a $1.455 \times g$ durante 10 minutos e o *buffy-coat* foi coletado e transferido para um tubo de prolipropileno de 15 mL, seguido da adição de 9 mL de tampão para lise dos glóbulos vermelhos. Após homogeneizar o tubo durante 15

minutos em temperatura ambiente, foi realizada centrifugação a $1.455 \times g$ durante 10 minutos. O procedimento foi repetido duas vezes. Posteriormente, foram adicionados 3 mL de solução de lise de células e 15 μL de RNase, com incubação da mistura em banho-maria a 37°C durante 15 minutos e manutenção em gelo por 3 minutos. Após adição de 1 mL de solução precipitante de proteínas e centrifugação a $2.000 \times g$ durante 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 3 mL de isopropanol. Para verificar a precipitação de DNA, o tubo foi homogeneizado e centrifugado a $2.000 \times g$ durante 3 minutos. Foram adicionados 3 mL de etanol 70% gelado, com posterior centrifugação a $2.000 \times g$ por 1 minuto. Após a evaporação do etanol, o DNA foi eluído em 200 μL de água RNase *free*, com posterior incubação a 65°C por 1 hora. Posteriormente, o DNA isolado foi estocado a -20°C até o momento de uso.

3.6.2 Construção do vetor para quantificação da CPV

3.6.2.1 Reação de amplificação dos fragmentos *pol* e β -globina

O DNA obtido foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real, de acordo com o protocolo a seguir: 10,5 μL de *Taqman*® *Universal PCR Master Mix*1X, 2,5 μL de *primer forward e reverse* específicos para as regiões *pol* do genoma viral (500 nM), 1,25 μL de *primer forward e reverse* específicos para a região β -globina (250 nM) e 1 μL das respectivas sondas (200 nM) marcadas com diferentes fluorocromos: FAM (HTLV-1) e NED (β -globina) (Tabela 3).

A seguir, a reação foi iniciada, com os seguintes ciclos de amplificação: 50 ciclos a 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos; 1 ciclo a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e 30 segundos. O equipamento utilizado para aquisição dos dados foi o *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems).

O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel Low Melting 2%, eliminando resíduos dos reagentes utilizados na PCR tais como fluorocromos e a seguir, purificado com o kit *QIAEx II Gel Extraction* (Qiagen), de acordo com instruções do fabricante.

Tabela 3. Sequência de *primers* e sondas para a região *pol* do genoma viral e para a região β -globina.

Gene	Primers	Seqüência (5'-3')
<i>Pol</i>	F	CAGCCCCTTCACAGTCTCTACTG
	R	AGAAGGATTTAAATATATTTGGTCTCGG
	Sonda	FAM- CCTTACAAAGGCATACTGAT –MGB
β -globina	F	TGAAGGCTCATGGCAAGAAA
	R	GGTGAGCCAGGCCATCAC
	Sonda	NED- TGCTCGGTGCCTTT- MGB

F: *primer sense*. R: *primer anti-sense*.

3.6.2.2 Ligação do fragmento de DNA amplificado ao vetor

A clonagem foi realizada a partir da reação de ligação do produto de PCR purificado no vetor PCR 2.1-TOPO (Invitrogen), na qual foram utilizados 4 μ L de produto amplificado, 1 μ L de solução salina e 1 μ L de vetor TOPO, seguido de incubação em temperatura ambiente por 30 minutos. Dessa forma, foram construídos dois vetores: Topo+ *pol* e Topo+ β -globina.

3.6.2.3 Transformação bacteriana

Para a transformação bacteriana, 2 μ L de mistura da ligação vetor/DNA inserto foram adicionados a 50 μ L de bactérias competentes Mach1™ - T1^R (Invitrogen) e submetidos ao choque térmico à 42°C por 1 minuto e gelo por 10 minutos. Após a adição de 270 μ L de S.O.C *Medium* (Invitrogen), a reação foi incubada, sob agitação, a 37°C por 60 minutos. Ao término da incubação, todo o volume foi semeado em placas com 5 mL de meio LB (Luria Bertani) ágar contendo 5 μ L de ampicilina a 100 mg/mL (concentração final 100 μ g/mL). Após a solidificação do meio, foram adicionados, na seguinte ordem: 40 μ L de isopropílico β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) 1M e 80 μ L de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo (X-Gal). As bactérias foram semeadas nas placas e mantidas a 37° C *overnight*.

3.6.2.4 Expansão dos clones em meio líquido

Algumas colônias foram inoculadas em 5 mL de meio LB líquido contendo 5 µL de ampicilina. A seguir, a cultura foi incubada, sob agitação, a 37°C *overnight*. O crescimento bacteriano foi visualizado por turvação do meio.

3.6.2.5 Extração de DNA plasmidial

As bactérias no meio líquido foram centrifugadas a $2.383 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e a seguir foi realizada a extração de DNA plasmidial com uso do kit *QIAprep® Spin Miniprep* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA obtido foi eluído em 50 µL de água *nuclease-free* e quantificado por espectrofotometria em absorbância de 260 nm para avaliação da concentração e pureza.

3.6.2.6 Amplificação do DNA plasmidial

Para confirmação da presença do inserto no plasmídeo foi realizada uma reação de amplificação do gene *pol* e *β-globina* clonados no vetor PCR 2.1 topo (Invitrogen), utilizando *primers forward* M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e *reverse* M13 (5'-CAGGGAACAGCTATGAC-3'). O produto amplificado foi submetido à análise por sequenciamento. A PCR convencional foi realizada da seguinte forma: para um volume final de 15 µL, foram utilizados 1,5 µL de Buffer 10X, 0,45 µL de MgCl₂ 50 mM, 1,5 µL de dNTPs 1,25 µM, 0,63 µL de *primers forward* M13 2,5 µMol, 0,63 µL de *primer reverse* M13 2,5 µMol, 0,2 µL de Taq DNA polimerase, 1 µL de DNA plasmidial (100 ng/µL) e 9,09 µL de água *nuclease-free*. Já as condições de ciclagem no termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) foram: 1 ciclo a 95° C por 3 minutos; 35 ciclos a 95° C por 40 segundos, a 60° C por 40 segundos e 72° C por 55 segundos; 1 ciclo a 72° C por 5 minutos. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% (Sigma Aldrich).

3.6.2.7 Sequenciamento do DNA plasmidial

O DNA plasmidial amplificado foi sequenciado utilizando o kit *BigDye® Terminator v3.1 CycleSequencing* (Applied Biosystems). Para um volume de 10 µL, foram utilizados 2 µL de tampão de sequenciamento 5X, 2 µL de *BigDye® Terminator v3.1*, 1 µL de primer *forward* M13, 1 µL de produto de PCR do DNA plasmidial e 4 µL de água *nuclease-free*. A seguir, a reação foi incubada a 1 ciclo de 95° C por 1 minuto; 25 ciclos a 96° C por 10 segundos, 50° C por 5 segundos e 60° C por 4 minutos. Posteriormente, foi realizada a precipitação do produto amplificado com adição de 40 µL de isopropanol 75% seguido de incubação por 20 minutos em temperatura ambiente e centrifugação a $3.270 \times g$ por 20

minutos. Após desprezar o sobrenadante por inversão, foram intercaladas duas etapas de adição de 200 µL de etanol a 70% e centrifugação por 5 minutos. O etanol foi removido através de *spin* da placa invertida. Para secagem, a placa foi envolvida no papel alumínio em temperatura ambiente. As amostras foram eluídas em 10 µL de *Hi-Di* formamida (Applied Biosystems), desnaturadas a 95°C por 3 minutos e aplicadas no sequenciador automático *ABI 3500 xL Genetic Analyzer*.

Após a obtenção dos eletroferogramas, estes foram analisados pelo programa *3500 Data Collection* (Applied Biosystems) e convertidos em sequências de nucleotídeos pelo programa *DNA Sequencing Analysis* versão 5.4 (Applied Biosystems). A montagem das seqüências consenso foi realizada pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.9.0 (Ibis Biosciences) e estas foram analisadas por meio do algoritmo *BLAST*.

3.6.3 Isolamento dos fragmentos *pol* e β -globina para construção do vetor plasmidial Topo HTLV+ β -globina

Para estabelecer a curva-padrão, foi construído por clonagem um plasmídeo em um vetor pCR 2.1-TOPO contendo tanto a região *pol* de interesse quanto o fragmento do gene β -globina (TOPO + β -globina + HTLV-1_ *pol*), conforme ilustrado na Figura 3.

Figura 3. Descrição das etapas da construção do vetor plasmidial TOPO + β -globina + HTLV-1_pol. Representados acima, estão os fragmentos β -globina (54pb) e *pol* (75pb) clonados no vetor pCR 2.1TOPO. Logo abaixo, a figura ilustra o processo da digestão enzimática dos fragmentos β -globina (1) e *pol* (2) com as enzimas XhoI e XbaI e SpeI e XhoI, respectivamente. Após a digestão da β -globina, o fragmento *pol* foi clonado no mesmo vetor (3 e 4), seguido do sequenciamento.

Inicialmente, os fragmentos *pol* e β -globina foram isolados por digestão com as enzimas *XhoI* e *XbaI*; *SpeI* e *XhoI*, respectivamente. Esta estratégia foi adotada para posterior ligação dos fragmentos ao vetor, pois as enzimas *XbaI* e *SpeI* são complementares. Para um volume de 20 μ L (vetor Topo + β -globina e vetor Topo + *pol*) foram utilizados 2 μ L de *buffer* 10 $\times$ *FastDigest*, 2 μ L das respectivas enzimas, 10 μ L de água *nuclease-free* e 2 μ g de DNA. A mistura foi incubada a 37°C por 60 minutos. Após a digestão, os produtos foram analisados através de eletroforese em gel *low melting* 2% e purificados com o kit *QIAEx II Gel Extraction* (Qiagen) de acordo com instruções do fabricante.

Os fragmentos de DNA purificados foram ligados ao vetor de acordo com a reação a seguir: 4 μ L de *Buffer ligase* 5X, 2 μ L de DNA do vetor, 6 μ L de DNA do inserto, 1 μ L de T4 DNA ligase e 7 μ L de água *nuclease-free*, para um volume final de 20 μ L. A reação foi incubada *overnight* a 16° C no termociclador e a seguir, foram realizadas etapas de transformação bacteriana, expansão em meio líquido, extração e amplificação do DNA plasmidial, e sequenciamento conforme descrito anteriormente (nos itens 5.2.2.3, 5.2.2.4, 5.2.2.5, 5.2.2.6 e 5.2.2.7).

3.6.4 Construção da curva-padrão

Após a confirmação das sequências de nucleotídeos dos fragmentos β -globina e *pol* no vetor TOPO, o plasmídeo foi utilizado para construção da curva-padrão. Para tanto, foi realizada uma curva de diluição seriada com o DNA do plasmídeo clonado com os fragmentos de interesse. Para este tipo de análise, a curva obedeceu alguns critérios para que o ensaio pudesse ser validado: eficiência próximo de 100%, *slope* (inclinação da reta) próximo de 3,3 (correspondente à eficiência da PCR entre 85 e 100%) e R^2 (coeficiente de correlação) >0,992.

3.6.5 Quantificação absoluta da carga proviral

A quantificação absoluta da carga proviral do HTLV-1 foi realizada por PCR quantitativa multiplex em tempo real utilizando *primers* e sondas para o gene *pol* (HTLV-1) e o gene endógeno β -globina (Tabela 3). Para um volume de 25 μ L, foram utilizados 1x (10,5 μ L) de *Taqman*® *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 500 ng de DNA genômico, *primers forward* e *reverse* específicos para as regiões *pol* do genoma viral (500 nM) e β -globina (250 nM). As sondas foram marcadas com diferentes fluorocromos: *pol* HTLV-1(FAM) e β -globina (NED), permitindo diferenciar os dois genes. A seguir, a reação foi submetida aos ciclos de amplificação: 50 ciclos a 50° C por 2 minutos e 95° C por 10

minutos; 1 ciclo a 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto e 30 segundos. O equipamento utilizado para aquisição dos dados foi o *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems).

3.7 Análises estatísticas

Para análise da carga proviral entre os grupos HAC e HAM/TSP foi realizada análise estatística utilizando teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, enquanto a comparação da concentração de partículas entre os grupos CT, HAC e HAM/TSP, foi analisada pelo teste ANOVA. A análise de correlação entre a expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* e a CPV foi realizada através de teste de correlação de *Spearman*. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos ($P < 0,05$). O programa *Graph Pad software Prism 6* (*Graph Pad Software*) foi utilizado para realizar todas as análises.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos indivíduos infectados pelo HTLV-1

Foram coletadas 18 amostras de sangue total de indivíduos infectados e controles, distribuídas em seis amostras de soro para cada grupo (grupo controle, indivíduos assintomáticos - HAC e sintomáticos para o HTLV-1 - HAM/TSP).

Os três grupos foram avaliados quanto à idade e ao gênero (Tabela 4). A idade variou entre 38 a 68 anos para o grupo controle (média de 52 anos), 39 a 68 anos para o grupo assintomático (média de 53 anos) e 42 a 66 anos para o grupo sintomático (média de 56 anos). Em relação ao gênero dos grupos controle e assintomático, quatro indivíduos foram do sexo feminino (66,6%) e dois do sexo masculino (33,3%). Para o grupo sintomático, todos os indivíduos foram do sexo feminino (100%).

Tabela 4. Distribuição do número de indivíduos dos diferentes grupos quanto ao gênero e à idade.

Característica	CT	HAC	HAM/TSP
Gênero			
Feminino	4	4	6
Masculino	2	2	0
Idade			
<50	3	3	2
>50	3	3	4
Média de idade (intervalo)	52 (38-68)	53 (39-68)	56 (42-66)
Total	6	6	6

CT: indivíduos sadios. HAC: indivíduos assintomáticos. HAM/TSP: indivíduos sintomáticos.

4.2 Comparação dos métodos de isolamento dos exossomos: Ultracentrifugação *versus* precipitação polimérica

No intuito de verificar uma metodologia eficiente na recuperação de exossomos do soro, foi realizado o isolamento dos mesmos por meio das técnicas de ultracentrifugação e precipitação polimérica (Exoquick™). A ultracentrifugação recuperou exossomos de tamanho $116,03 \pm 7,96$ nm enquanto a metodologia de precipitação polimérica, tamanho entre $110,43 \pm$

6,0 nm. Portanto, ambas as metodologias foram eficazes no isolamento de exossomos (30-150 nm) quando avaliados pelo tamanho (Apêndice A).

No entanto, em relação ao número de partículas, os dados demonstram que a técnica de precipitação polimérica isolou maior concentração de partículas/mL ($8,64 \times 10^8 \pm 3,69 \times 10^7$) em relação à ultracentrifugação ($2,52 \times 10^8 \pm 3,04 \times 10^7$) (Apêndice B). Foi realizada análise estatística (Teste t não-pareado) que indicou um aumento da eficiência de 3,4 vezes utilizando Exoquick™ ($p=0,0146$, $p<0,05$) (Figura 4). Dessa forma, o método da precipitação polimérica foi eleito para o isolamento e caracterização dessas vesículas.

Figura 4. Eficiência dos métodos de ultracentrifugação e Exoquick™ de acordo com o número de partículas analisadas por NTA. Após o isolamento de exossomos do soro, a purificação com o Exoquick™ foi mais eficiente do que a ultracentrifugação ($p=0,0146$).

4.3 Caracterização dos exossomos

4.3.1 Detecção dos marcadores exossomais por *Western Blot*

As vesículas isoladas foram caracterizadas por *Western Blot* e apresentaram a expressão de proteínas comumente detectadas em exossomos, especialmente as proteínas transmembrana CD9 (24 kDa) e CD81 (26 kDa), além da proteína citosólica Alix (95 kDa). A ausência do citocromo c (15 kDa) nos exossomos e a presença na linhagem MT-2 indicou ausência/baixos níveis de contaminação com *debris* celulares e outras vesículas de origem não-endossomal (Figura 5).

Além disso, os exossomos foram avaliados quanto à expressão da proteína viral Tax (42 kDa). Esta técnica foi considerada padronizada, uma vez que a proteína Tax teve a sua expressão detectada na amostra MT-2 (controle positivo). As amostras exossomais provenientes de indivíduos saudáveis (CT), utilizadas como controle negativo, não expressaram

essa proteína, conforme esperado. No entanto, Tax não foi detectada nas amostras exossomais provenientes de indivíduos assintomáticos (HAC) e sintomáticos (HAM/TSP).

Figura 5. Expressão de Alix, CD81 e CD9 por Western Blot em exossomos derivados do soro. Foram analisadas 60 µg de proteína em gel 12% quanto à expressão de marcadores exossomais utilizando os anticorpos com especificidade para Alix, CD81, CD9 e citocromo c. Além disso, foi avaliada a incorporação da proteína viral Tax. Os tamanhos das bandas de interesse estão indicados à direita em kilodaltons (kDa). A ausência de citocromo c demonstra a pureza do preparo exossomal. CT 17, CT 20, CT 22 e CT 23: grupo controle. HAC 07, HAC 17, HAC 20, HAC 22, HAC 24 e HAC 25: grupo assintomático. HAM/TSP 10, HAM/TSP 18, HAM/TSP 21, HAM/TSP 23, HAM/TSP 27 e HAM/TSP 28: grupo sintomático. MT-2: linhagem celular infectada pelo HTLV-1.

4.3.2 Avaliação do tamanho e concentração por NTA

Para análise da distribuição do tamanho dos exossomos, bem como sua concentração/mL, foi realizado o NTA. Os grupos controle, sintomáticos e assintomáticos para o HTLV-1 apresentaram partículas com média de tamanho de $116,98 \pm 5,53$, $127,15 \pm 6,08$ e $126,63 \pm 6,15$ nm, respectivamente, conforme demonstrado na Figura 6. Os dados do tamanho de todas as amostras avaliadas estão representados no Apêndice C.

Outro parâmetro avaliado foi a concentração de partículas/mL e a seguir foi realizada uma comparação entre os três grupos avaliados (Apêndice D). Embora nenhuma diferença significativa tenha sido observada entre os três grupos, os indivíduos sintomáticos infectados pelo HTLV-1 apresentaram maior média de partículas/mL ($1,50 \times 10^9 \pm 6,63 \times 10^7$) quando comparada com a do grupo assintomático ($1,39 \times 10^9 \pm 7,69 \times 10^7$). Já o grupo controle apresentou menor número de partículas ($0,91 \times 10^9 \pm 3,42 \times 10^7$).

Figura 6. Distribuição do tamanho e concentração das vesículas isoladas do soro humano por Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA). O tamanho (A) foi expresso em escala de nanômetro (nm) e a concentração (B) como o número de partículas ($\times 10^9$) por mililitros (mL) de suspensão.

4.4 Análise do perfil de RNA exossomal

Para avaliar a detecção do RNA exossomal obtido do soro dos grupos controle (CT), assintomáticos (HAC) e sintomáticos (HAM/TSP) e comparar com o RNA celular proveniente da linhagem MT-2 foi realizado o *Bioanalyzer*.

As amostras de RNA exossomais apresentaram concentração variando entre 16,7 e 37,7 ng/ μ L. Pouco ou nenhum RNA ribossomal foi detectado nos exossomos provenientes de soro (relação 18S/28S igual ou próximo de zero), ao passo que o mesmo foi detectado no RNA celular (relação 18S/28S igual a dois) (Apêndice E).

Os eletroferogramas ilustraram diferenças nos perfis de tamanho de RNA. Foram detectados pequenos RNA nos exossomos (Figura 7A), diferentemente do RNA celular que apresentou pico próximo de 1800 (18S) e 4000 (28S) nucleotídeos (Figura 7B).

Figura 7. Análise do RNA total exossomal e celular. O RNA total exossomal e celular isolado com associação de Trizol e coluna foi analisado utilizando *RNA Nano 6000 Kit em um Agilent 2100 Bioanalyzer*. Os eletroferogramas mostram a distribuição de tamanho em nucleotídeos (nt) no eixo x e no eixo y unidade de fluorescência (FU, do inglês *fluorescence units*) do RNA total em (A) exossomo e (B) célula. O pico de 25 nucleotídeos é um padrão interno. Os resultados mostram que exossomos do soro contêm pouco ou nenhum RNA ribossomal, diferente do RNA celular.

4.5 Quantificação relativa de *tax* e *HBZ*

Foi realizada quantificação relativa da expressão dos níveis de RNAm de *tax* e *HBZ* nos exossomos isolados do soro de indivíduos saudáveis (CT), assintomáticos (HAC) e sintomáticos (HAM/TSP) para o HTLV-1. Os resultados indicaram ausência de transcritos de RNAm virais em exossomos purificados do soro de indivíduos saudáveis. Já os pacientes sintomáticos para o HTLV-1, ao contrário dos pacientes assintomáticos para o vírus, demonstraram a presença de tais genes nessas vesículas, conforme demonstrado na Figura 8. Os valores de C_t obtidos estão representados no Apêndice F.

Figura 8. Curva de Amplificação para os genes *ACTB*, *tax* e *HBZ* em exossomos isolados do soro de indivíduos sintomáticos e assintomáticos para o HTLV-1. Ambos os grupos, sintomáticos (A) e assintomáticos (B) apresentaram a expressão de *ACTB* (β -actina) ao passo que os genes *tax* e *HBZ* foram identificados apenas no grupo sintomático.

Após normalização com o gene β -actina, os valores de C_t foram avaliados em Unidade Relativa de Expressão (URE). A linhagem MT-2, infectada pelo HTLV-1, foi utilizada como controle positivo para a expressão dos genes virais.

Figura 9. Análise da expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* em exossomos derivados do soro de pacientes infectados pelo HTLV-1 por PCR em tempo real. A linhagem MT-2 foi utilizada como controle positivo para a expressão de tais genes. Os resultados foram expressos em Unidade Relativa de Expressão (URE) após normalização com o gene β -actina e demonstram que exossomos oriundos apenas de indivíduos sintomáticos contêm transcritos de RNAm virais.

4.6 Carga proviral do HTLV-1

4.6.1 Construção da Curva-Padrão

Para determinação da carga proviral foi construído um vetor plasmidial contendo tanto a região *pol* de interesse quanto o fragmento do gene β -globina (Topo + β -globina + HTLV-1_ *pol*). Para isso, o vetor Topo + β -globina foi digerido para posterior ligação do gene *pol* no mesmo vetor. Para confirmação da digestão do vetor Topo + β -globina e Topo + *pol* com as enzimas *XhoI* e *XbaI*, e *SpeI* e *XhoI*, respectivamente, os fragmentos obtidos foram analisados em gel *low melting* 2%, conforme demonstrado na Figura 10.

Figura 10. Gel *low melting* 2% com produtos da digestão enzimática. Em (A) está representado o Topo + β -globina (3.974 pb) após digestão com as enzimas *XhoI* e *XbaI*. Em (B) está representado o Topo (3.781pb) + *pol* (150 pb) após digestão com as enzimas *SpeI* e *XhoI*. Linhas 1 a 6: clones. M: marcador de peso molecular 100 pb.

Após a confirmação da digestão, foi realizada a ligação de *pol* no vetor Topo + β -globina com a T4 DNA ligase. Para confirmar a ligação de ambos os fragmentos (Figura 11) foi realizada amplificação do produto de PCR utilizando primer M13 e visualização em gel de agarose 2%, que demonstrou uma banda de 204 pb, correspondente ao tamanho de ambos os fragmentos (β -globina 54 pb e *pol* de 150 pb).

Figura 11. Gel de agarose 2% com produtos do PCR. Representação das bandas obtidas de β -globina (54 pb) + *pol* (150 pb), após ligação dos fragmentos no vetor Topo totalizando 204 pb. Linhas 1 a 7: clones. M: marcador de peso molecular 100 pb. BCO: branco.

Para a confirmação das sequências de nucleotídeos dos fragmentos *pol* e β -globina no vetor Topo, foi realizado o sequenciamento do DNA plasmidial, que demonstrou a incorporação de ambos os fragmentos, conforme demonstrado na Figura 12.

Figura 12. Sequenciamento de nucleotídeos dos fragmentos *pol* e β -globina.

Após a confirmação das sequências de nucleotídeos dos fragmentos β -globina e *pol* no vetor Topo, o plasmídeo foi utilizado para construção da curva-padrão. Para a obtenção da curva-padrão, foi realizada uma diluição seriada na base 10 do plasmídeo contendo *pol* e β -globina, com obtenção da curva de regressão linear para ambos os genes. A eficiência da reação de PCR em tempo real foi determinada da seguinte maneira:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1 \times 100$$

Onde:

E= eficiência da reação

Slope= inclinação da reta

Dessa forma, a partir do *slope* de cada curva-padrão, foram obtidas as eficiências das reações de amplificação para HTLV-1 (*pol*) e β -globina que se apresentaram similares, com

102,78 e 103,98, respectivamente (a eficiência de amplificação aceita uma variação entre 85% a 105%). Os valores de Ct obtidos foram próximos para a mesma diluição do plasmídeo, como demonstrado na Tabela 5. Dessa forma, o gene *β-globina* foi utilizado como um padrão interno eficiente para normalizar os resultados da quantificação do HTLV-1.

Tabela 5. Curva-padrão do plasmídeo HTLV-1 *pol* + *β-globina* obtida com diferentes diluições.

Nº de cópias	Média Ct*	
	HTLV-1	<i>β-globina</i>
10^{10}	8,87	8,73
10^9	11,27	10,94
10^8	14,08	13,69
10^7	17,63	17,12
10^6	21,22	20,84
10^5	24,61	24,17
10^4	27,55	27,19
10^3	31,04	30,69
10^2	34,41	33,84
<i>Slope</i> **	-3,26	-3,23
Eficiência da PCR (%) ***	102,78	103,98

*valores do ciclo obtidos pela média da duplicata de cada ponto da curva de calibração.

***Slope*: inclinação da reta.

***eficiência de amplificação, calculada como $(10^{(-1/slope)} - 1) \times 100$.

Representada na Figura 13A, a curva-padrão foi feita a partir da interpolação dos Ct obtidos de cada reação (eixo y) e as respectivas quantidades de DNA presentes nas amostras (eixo x). A curva foi então representada pela equação $y = ax + b$. As retas de regressão linear apresentaram coeficiente de correlação (r^2) da curva-padrão de 0,998 para ambos os genes. Na Figura 13B, está representada a curva de amplificação obtida com a diluição seriada (10^{10} a 100 cópias) do plasmídeo contendo *pol* e *β-globina*. O eixo y representa a intensidade de fluorescência normalizada (ΔR_n) e o eixo x, o número de ciclos de PCR. Cada diluição foi testada em duplicata.

Figura 13. Curva-padrão e de amplificação para a quantificação de *pol* e β -globina por PCR em tempo real. (A) Curva-padrão obtida por análise de regressão linear dos valores de C_T representados no eixo y e as respectivas quantidades de DNA presentes nas amostras no eixo x. (B) Curva de amplificação obtida com diluição seriada (10^{10} a 100 cópias) do plasmídeo contendo *pol* e β -globina. O eixo y representa a intensidade de fluorescência normalizada (ΔR_n) e o eixo x, o número de ciclos de PCR. Cada diluição foi testada em duplicata.

4.7 Quantificação da Carga Proviral

A partir da curva-padrão, a carga proviral dos pacientes foi calculada. Para medir a quantidade de provírus presentes nas células sanguíneas periféricas dos indivíduos infectados

foi realizada PCR em tempo real quantitativa. A média da carga proviral detectada no grupo assintomático foi de 4.457,49 enquanto o grupo sintomático apresentou média de 36.386,09 cópias/ 10^5 células, como observado na Tabela 6.

Tabela 6. Carga proviral dos indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Amostra	Carga Proviral (cópias/ 10^5 células)	Média
HAC 07	64, 94	4.457,497
HAC 17	5.032,53	
HAC 20	81,07	
HAC 22	5.371,80	
HAC 24	2.230,91	
HAC 25	13.963,73	
HAM/TSP 10	34.752,90	36.386,09
HAM/TSP 18	38.450,79	
HAM/TSP 21	31.925,13	
HAM/TSP 23	32.028,19	
HAM/TSP 27	39.849,66	
HAM/TSP 28	41.309,86	

HAC: indivíduos assintomáticos. HAM/TSP: indivíduos sintomáticos.

Foi realizada análise estatística utilizando o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* e os resultados obtidos indicaram um aumento de aproximadamente 8,2 vezes da carga proviral dos pacientes sintomáticos (HAM/TSP) quando comparada com portadores assintomáticos (HAC) ($p=0,0022$) (Figura 14).

Figura 14. Distribuição da carga proviral do HTLV-1 (nº de cópias/10⁵ células) em pacientes assintomáticos (HAC) e sintomáticos (HAM/TSP). A barra horizontal representa o valor da mediana da carga proviral para cada grupo. Foi utilizado o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* ($p=0,0022$, $p<0,05$).

4.8 Análise da relação da CPV com os genes virais *tax* e *HBZ*

Após análise da expressão dos genes *tax* e *HBZ* em amostras exossomais dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 foi avaliada se existe alguma correlação entre a expressão desses genes virais e a CPV. As análises estatísticas para *tax* e *HBZ* apresentaram correlação positiva com a CPV ($r=0,5908$ e $P=0,0471$; $r=0,6004$ e $P=0,0434$, respectivamente). Para tanto, foi utilizado teste de correlação de *Spearman* (Figura 15).

Figura 15. Correlação entre a expressão dos genes *tax* e *HBZ* com a CPV. Correlação entre a expressão de *tax* e CPV (A) e correlação entre a expressão de *HBZ* e CPV (B). As análises revelaram uma correlação positiva e um valor de P significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de correlação de *Spearman*.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi comparado o conteúdo exossomal do soro de indivíduos infectados assintomáticos e sintomáticos pelo HTLV-1 quanto à expressão dos genes virais *tax* e *HBZ*. Um crescente número de trabalhos relata o envolvimento de exossomos em infecções virais devido à sua capacidade de transportar moléculas como RNAm, bem como proteínas entre as células (CHAHAR; BAO; CASOLA, 2015). Embora alguns estudos relatem o papel dos exossomos em diferentes processos patológicos, há um número limitado que relatam a sua função *in vivo*. Assim, a investigação do conteúdo dos exossomos provenientes diretamente do soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1 pode trazer informações importantes no entendimento da patogênese da infecção. A HAM/TSP atinge cerca de 5% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 e provoca a desmielinização crônica progressiva da medula espinhal, caracterizada por paraparesia espástica dos membros inferiores, cujos mecanismos de patogênese permanecem incertos.

Nesse sentido, no presente estudo, os exossomos foram isolados a partir do sangue, uma vez que esse fluido biológico pode fornecer informações úteis sobre o estado clínico do paciente, além de permitir uma coleta minimamente invasiva. Primeiramente, foram coletadas amostras de sangue de pacientes infectados pelo HTLV-1, tanto assintomáticos (HAC) quanto sintomáticos (HAM/TSP). Em relação à distribuição dos diferentes grupos quanto ao gênero e à idade, os indivíduos HAM/TSP apresentaram uma média de idade de 56 anos e esse dado condiz com a literatura, uma vez que a maior incidência ocorre por volta da quinta década de vida, sendo raro em crianças (MALONEY et al., 1998). Em relação ao gênero, todos os indivíduos sintomáticos para o HTLV-1 foram do sexo feminino, corroborando com estudos que indicam que as mulheres possuem maior susceptibilidade à doença, embora o motivo permaneça desconhecido (KAPLAN et al., 1996; MALONEY et al., 1998).

Para a obtenção de exossomos a partir do sangue, a fração sanguínea contendo o soro foi escolhida tendo em vista que estudos apresentam algumas vantagens quanto ao uso desse fluido quando comparado com o plasma, tais como: maior quantidade de vesículas (GEORGE et al., 1982), maior reprodutibilidade no isolamento de vesículas devido à grande quantidade de proteínas no plasma (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015), além da facilidade na dissolução do “pellet” exossomal quando utilizado o método de isolamento pelo Exoquick™ (SÁENZ-CUESTA et al., 2015).

Apesar do crescente número de trabalhos envolvendo vesículas, um dos entraves nesses estudos se refere aos procedimentos de isolamento, em especial de exossomos. Nesse estudo,

foram avaliados dois métodos de isolamento: ultracentrifugação e precipitação polimérica (Exoquick™), uma vez que a primeira é considerada uma técnica comumente utilizada para o isolamento de vesículas e a outra apresenta potencial aplicação clínica na utilização de biofluidos. No entanto, não há um consenso na literatura sobre o melhor método para a purificação dessas vesículas. Portanto, a escolha do método de isolamento depende de fatores como o tipo de amostra e a sua posterior aplicação no estudo.

Desse modo, no intuito de verificar qual dessas metodologias é a mais eficiente para a recuperação de maior quantidade de exossomos do soro, foi feita uma comparação do tamanho (em nm) e da concentração de partículas/mL obtidas. O *software NTA* permitiu analisar tais medidas com base no movimento *browniano* após a utilização de padrões de difração de luz. Quanto ao tamanho das partículas, verificou-se que o mesmo foi condizente ao tamanho exossomal relatado na literatura por ambas as metodologias (ultracentrifugação: $116,03 \pm 7,96$ nm; precipitação polimérica: $110,43 \pm 6,0$ nm), cujo tamanho exossomal característico pode variar entre 30 e 150 nm (LANE et al., 2015). Em relação à concentração, a técnica de precipitação polimérica purificou maior quantidade de partículas com tamanho condizente ao exossomal, com um aumento na eficiência de 3,4 vezes quando comparada com a ultracentrifugação (precipitação polimérica: $8,64 \times 10^8 \pm 3,69 \times 10^7$ partículas/mL; ultracentrifugação: $2,52 \times 10^8 \pm 3,04 \times 10^7$ partículas/mL). Esses dados corroboram com os achados de Caradec e cols (2014), que demonstraram que embora a ultracentrifugação seja comumente utilizada, a precipitação polimérica foi considerada a técnica mais adequada para o isolamento de exossomos a partir do soro (CARADEC et al., 2014).

Além disso, é relatado que métodos como a precipitação polimérica permitem maior rapidez, eficiência e reprodutibilidade sem a necessidade de um equipamento especializado (CROSSLAND et al., 2015). Alguns estudos descreveram que a ultracentrifugação não é considerada uma técnica padronizada entre os laboratórios, pois existem muitas variáveis que podem afetar a purificação, tais como a força g aplicada, o tipo de rotor e o tempo de rotação (MOMEN-HERAVI et al., 2013; WITWER et al., 2013). Apesar do uso do Exoquick™ resultar na precipitação de contaminantes como agregados proteicos, e ainda possuir um elevado custo, este é considerado um método eficiente para análise de RNA exossomal (ALVAREZ et al., 2012). Portanto, a precipitação polimérica foi o método adotado para o isolamento de exossomos do soro dos três grupos avaliados, pois é um método simples, rápido e eficaz.

A partir do isolamento de exossomos dos diferentes grupos utilizando a precipitação polimérica, foi realizada a comparação da concentração de partículas entre os indivíduos saudáveis, assintomáticos e sintomáticos para o HTLV-1. Embora os indivíduos HAM/TSP apresentassem maior número dessas partículas quando comparado com os grupos CT e HAC, não foi constatada uma diferença estatisticamente significativa entre esses grupos. Esse achado é discordante com pesquisas que demonstram uma elevada concentração de vesículas no sangue e fluidos corporais de indivíduos com diferentes condições patológicas quando comparados com indivíduos saudáveis (CAIVANO et al., 2015; LOGOZZI et al., 2009; QAZI et al., 2010). Isso pode ser explicado pelo fato de que o nível de exossomos no soro humano pode variar dependendo de muitos fatores além das doenças associadas, tais como idade, período da coleta da amostra em relação ao ritmo circadiano, *status* pós-prandial (KIERULF et al., 2015), atividade física (CHAAR et al., 2011; MÖBIUS-WINKLER et al., 2009), além de fatores como índice de massa corporal (IMC), uso de medicamentos e gripes (WITWER et al., 2013).

Além disso, outro fator importante a ser relatado é que os exossomos presentes no soro são provenientes de uma variedade de células e essa heterogeneidade pode limitar a detecção de exossomos específicos das células infectadas em amostras de sangue periférico (HUANG et al., 2013). Consequentemente, pode não ser observado um aumento significativo na população de exossomos infectados pelo HTLV-1 nesse fluido biológico, tendo em vista o vasto número de exossomos provenientes de células não infectadas.

Por outro lado, o fluido cérebro-espinhal pode conter um número maior de células infectadas, uma vez que a HAM/TSP está associada com a migração de células T infectadas, consideradas o principal reservatório do HTLV-1, para o SNC (LEZIN et al., 2005). No SNC, os astrócitos e as células T CD4⁺ representam as células que possuem produtos proteicos virais em seu citoplasma, assim como DNA proviral integrado ao genoma celular (PROIETTI, 2015). Nesse sentido, Anderson et al. (2015) demonstraram a presença da proteína Tax nos exossomos isolados desse fluido biológico (ANDERSON et al., 2015). Além disso, sabe-se que indivíduos HAM/TSP apresentam elevada expressão de *tax* e CPV no fluido cérebro-espinhal quando comparado com PBMC (NAGAI et al., 2001).

Além do tamanho e concentração, os exossomos foram avaliados quanto à presença de proteínas características por *Western Blot*. Conforme recomendado pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares, a caracterização dos exossomos isolados nesse estudo atendeu os três requisitos mínimos para a identificação de proteínas exossomais:

presença de proteína transmembrana (CD9 e CD81) e proteína citosólica (Alix), além da ausência de proteína intracelular (citocromo c, de origem mitocondrial), indicando a não contaminação com *debris* celulares ou outras vesículas (LÖTVALL et al., 2014). É estabelecido que os exossomos sejam capazes de incorporar tais proteínas durante o processo de biogênese, a partir da invaginação da membrana endossomal tardia.

A presença de vesículas extracelulares em diferentes fluidos biológicos e a descoberta que essas vesículas contêm moléculas associadas, incluindo RNA, despertaram grande interesse da comunidade científica na descoberta de biomarcadores em diferentes doenças. Como preconizado pela Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares, a distribuição do tamanho do RNA da vesícula extracelular deve ser analisada e esses dados devem ser incluídos nesse tipo de estudo (HILL et al., 2013). Sendo assim, para análise do RNA exossomal foi utilizado o *Bioanalyzer*. Pela análise dos dados, pode-se observar ausência ou mínima quantidade de RNA ribossomal 18S e 28S, o que indica que o RNA encontrado nos exossomos é composto majoritariamente por RNAm e microRNA. Além disso, os picos de RNA ribossomal 18S e 28S foram detectados apenas nas células infectadas pelo HTLV-1. Esses achados corroboram com a literatura, uma vez que o padrão de RNA exossomal difere consideravelmente quando comparado com RNA celular (ELDH et al., 2012; LÄSSER et al., 2011). Isso pode ser explicado por estudos que demonstram que o empacotamento de RNA em exossomos é seletivo, pois os perfis de RNA exossomais não refletem fidedignamente os perfis de RNA observados nas células parentais (SKOG et al., 2012; VALADI et al., 2007).

Com relação à escolha de qual região do genoma viral seria estudada, *tax* e *HBZ* foram eleitos, uma vez que ambos são os genes regulatórios que desempenham importantes papéis na patogênese da HAM/TSP. Foi demonstrada que a elevada expressão de RNAm de *tax* é considerada um marcador de risco para a HAM/TSP, pois indivíduos sintomáticos apresentaram maior expressão quando comparado com indivíduos assintomáticos. Além disso, indivíduos assintomáticos com baixa CPV apresentaram menor expressão de *tax* quando comparado com indivíduos assintomáticos de elevada CPV. Já a elevada expressão do RNAm de *HBZ* parece ser um marcador para a progressão da doença, pois foi significativamente associada com a deficiência motora em pacientes HAM/TSP (ANDRADE et al., 2013). Nesse sentido, o presente estudo avaliou a expressão de *tax* e *HBZ* nos exossomos dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 através das metodologias de *Western Blot* e PCR quantitativa.

A proteína Tax não foi identificada nas amostras exossomais por *Western Blot*. Sabe-se que as vesículas extracelulares derivadas de fluidos biológicos como o soro são produzidas por uma variedade de células, a maioria plaquetas, enquanto o restante é produzido por células endoteliais e leucócitos. Os linfócitos, principais células envolvidas na infecção pelo HTLV-1, representam <1% das células no sangue total. Dessa forma, existe uma baixa quantidade de célula infectada por esse retrovírus no sangue e o isolamento de exossomos a partir de um tipo celular específico (principalmente linfócito T) é ainda considerado um desafio (CABY et al., 2005).

No entanto, ao avaliar a expressão gênica a partir de uma metodologia considerada altamente sensível e específica para detecção de fragmentos gênicos, PCR em tempo real, os genes *tax* e *HBZ* foram detectados nos exossomos isolados exclusivamente do grupo sintomático para o HTLV-1. Dutta e cols. (2015) identificaram um perfil semelhante por análise proteômica: ausência de Tax e HBZ no grupo HAC e expressão detectável na HAM/TSP. Foi demonstrada ainda elevada expressão de tais proteínas na ATL. Nesse estudo, os exossomos foram isolados do soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1, e por espectrometria de massas, 784 proteínas foram identificadas, das quais 208 apresentaram diferença significativa na expressão. Tal abordagem permitiu discriminar os grupos HAC, HAM/TSP e ATL (DUTTA et al., 2015). Portanto, esses dados reforçam a hipótese de que os exossomos apresentam um importante papel na patogênese da HAM/TSP e podem ser potenciais biomarcadores com valores no prognóstico e diagnóstico da doença.

Além da expressão de *tax* e *HBZ*, um marcador amplamente utilizado para determinar o desenvolvimento da HAM/TSP é a carga proviral, que estima a quantidade de provírus presente nas células. Diferentes métodos já foram descritos para determinação da carga proviral. Inicialmente, foi utilizada a técnica de *Southern Blot* (YOSHIDA et al., 1989) que consistia na detecção de fragmentos de DNA proviral com uma sonda específica para o HTLV-1 (hibridização). Em seguida, foi desenvolvida a PCR semi-quantitativa, baseada na análise da intensidade das bandas amplificadas após diluição das amostras (KIRA et al., 1991; TOSSWILL et al., 1998). No entanto, a quantificação da CPV por estas técnicas apresentavam resultados discrepantes devido à falta de padronização da técnica, relacionada principalmente às diluições seriadas das amostras de DNA, além da baixa acurácia da análise dos resultados. Posteriormente, foi desenvolvida a PCR quantitativa-competitiva (QC-PCR), baseada na amplificação simultânea do DNA de interesse e do competidor (DNA em quantidade conhecida de célula infectada) em uma mesma reação, porém apresentou

dificuldades em ser implementada na rotina por ser muito laboriosa. (ALBRECHT et al., 1998; LEHKY et al., 1998). Atualmente, a PCR em tempo real é o método mais utilizado e foi o escolhido para este projeto devido a sua rapidez, precisão e acurácia.

Sendo assim, o gene *pol* foi utilizado para quantificação do DNA do HTLV-1 e a CPV foi normalizada com o gene celular *β -globina*. A metodologia utilizada para a construção da curva-padrão foi baseada no trabalho de Deheé e cols., uma vez que se apresentou como uma curva de fácil preparo e altamente reprodutível (DEHÉE et al., 2002). Para tanto, foi construído um plasmídeo contendo ambos os fragmentos para evitar variação entre as diluições virais (*pol*) e celulares (*β -globina*). Isso foi demonstrado com os valores de Ct obtidos, que foram próximos para a mesma diluição do plasmídeo. Além disso, as eficiências das reações de amplificação (medida de desempenho global para o ensaio de PCR) para HTLV-1 (*pol*) e *β -globina* foram similares, com 102,8 e 103,4, respectivamente. Portanto, essa foi a metodologia escolhida para a construção da curva-padrão.

Os portadores assintomáticos para o HTLV-1 apresentaram uma média de 4.457,5 cópias/ 10^5 células (variando entre 7,8-5.376,2) enquanto os sintomáticos apresentaram uma média de 36.386,1/ 10^5 células (31.394,5-37.154,2). Dessa forma, foi observado um aumento significativo na CPV de aproximadamente oito vezes na HAM/TSP quando comparada com o grupo HAC. Esses dados estão de acordo com o descrito na literatura, pois vários estudos demonstraram que tal aumento está associado com o desenvolvimento da HAM/TSP (NAGAI et al., 1998; NIEDERER et al., 2014). Contudo, apenas a CPV é insuficiente para determinar o desenvolvimento da doença, pois há trabalhos que demonstram que indivíduos podem apresentar elevada CPV sem qualquer sintomatologia (TAYLOR et al., 1999). Nesse contexto, esse trabalho sugere que os exossomos podem ser um marcador mais adequado, principalmente para a avaliação da progressão da HAM/TSP. No entanto, estudos adicionais são necessários a fim de confirmar esse dado.

Este estudo é o primeiro relato que demonstra a detecção dos genes *tax* e *HBZ* nos exossomos isolados do soro de pacientes HAM/TSP infectados pelo HTLV-1. Jaworski e cols. (2014) identificaram transcritos de RNAm virais incluindo *tax*, *HBZ* e Env em exossomos de linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1 (JAWORSKI et al., 2014). Os autores também foram capazes de identificar a proteína Tax nesses exossomos, ao contrário desse estudo. No entanto, vale salientar que o volume de amostra utilizado para o isolamento dessas vesículas no presente estudo (2 mL de soro) é um ponto crítico quando comparado com grandes volumes obtidos da cultura celular *in vitro* (100 mL de sobrenadante). Outro fator

envolvido, como já demonstrado por Caradec e cols. (2014), é que a quantificação de proteínas do soro não reflete a quantidade proteica dos exossomos, uma vez que esse fluido biológico é rico em proteínas não-exossomais, tais como a albumina e imunoglobulina G (CARADEC et al., 2014).

Portanto, o isolamento de exossomos a partir do soro é mais complexo do que o uso de sobrenadante de cultura celular, pois as vesículas do soro são derivadas de diferentes tipos celulares em variadas proporções, o que torna difícil o isolamento de um tipo celular específico. Apesar dos desafios quanto ao uso de biofluidos, tais como o soro, estes são amplamente utilizados em estudos na descoberta de biomarcadores.

Dessa forma, a vantagem do presente trabalho em relação ao de Jaworski e cols. (2014) é que os exossomos foram avaliados diretamente do soro de indivíduos infectados por esse vírus. Sabe-se que os estudos *in vitro* podem não reproduzir inteiramente estudos *in vivo*. Em relação à infectividade do HTLV-1, fatores como a resposta imunológica e a CPV podem diferir entre os indivíduos infectados por esse retrovírus, tornando a abordagem *in vivo* mais complexa.

Por fim, foi observada uma correlação positiva entre a expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* e a CPV, sugerindo que os exossomos podem desempenhar um importante papel na patogênese da mielopatia. Desse modo, considerando o papel dos genes *tax* e *HBZ* na patogênese viral e a função dos exossomos na entrega de RNAm, cuja composição pode variar entre os diferentes estados clínicos da doença, estes podem ser investigados como marcadores diagnóstico e prognóstico para a HAM/TSP. No entanto, mais estudos que relacionam o papel dos exossomos na infecção pelo HTLV-1 são necessários.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- A precipitação polimérica foi a metodologia mais eficiente para a recuperação de exossomos isolados do soro humano;
- Os exossomos isolados por precipitação polimérica apresentaram tamanho característico dessas vesículas;
- Os exossomos apresentaram proteínas características dessas vesículas como as tetraspaninas CD9 e CD81, a proteína citosólica Alix, além da ausência de citocromo c;
- Não foi detectado aumento na concentração de exossomos nos indivíduos infectados pelo HTLV-1, assintomáticos e sintomáticos, em relação ao grupo de indivíduos saudáveis;
- Os transcritos de RNA de *tax* e *HBZ* foram detectados apenas em exossomos isolados do soro dos indivíduos sintomáticos, com ausência nos assintomáticos;
- Os indivíduos sintomáticos para o HTLV-1 apresentaram aumento na carga proviral quando comparada com os indivíduos assintomáticos;
- A expressão de *tax* e *HBZ* foi correlacionada positivamente com a CPV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADMYRE, C. et al. Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. **The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology**, v. 22, n. 4, p. 578–583, 2003.

ALBRECHT, B. et al. Quantification of human T-cell lymphotropic virus type 1 proviral load by quantitative competitive polymerase chain reaction. **Journal of virological methods**, v. 75, n. 2, p. 123–140, 1998.

AL-DOSSARY, A. A.; STREHLER, E. E.; MARTIN-DELEON, P. A. Expression and secretion of plasma membrane Ca²⁺-ATPase 4a (PMCA4a) during murine estrus: Association with oviductal exosomes and uptake in sperm. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–14, 2013.

ALVAREZ, M. L. et al. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. **Kidney International**, v. 82, n. 9, p. 1024–1032, 2012.

ANDERSON, M. et al. Detection of Human T-cell Lymphotropic Virus Type I proteins in exosomes from HAM/TSP patient CSF by novel nanotrap technology (I7-5E). **Journal of NeuroVirology**, v. 84, p. 14 Supplement I7–5E, 2015.

ANDRADE, R. G. et al. Strong correlation between tax and HBZ mRNA expression in HAM/TSP patients: Distinct markers for the neurologic disease. **Journal of Clinical Virology**, v. 56, n. 2, p. 135–140, 2013.

BAIXAULI, F.; LÓPEZ-OTÍN, C.; MITTELBRUNN, M. Exosomes and autophagy: coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness. **Frontiers in immunology**, v. 5, n. August, p. 403, jan. 2014.

BANGHAM, C. R. M. et al. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Nature Reviews Disease**, v. 1, p. 1–17, 2015.

BASBOUS, J. et al. The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 44, p. 43620–7, 31 out. 2003.

CABY, M.-P. et al. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. **International immunology**, v. 17, n. 7, p. 879–887, 2005.

CAIVANO, A. et al. High serum levels of extracellular vesicles expressing malignancy-related markers are released in patients with various types of hematological neoplastic disorders. **Tumor Biology**, v. 36, n. 12, p. 9739–9752, 2015.

CARADEC, J. et al. Reproducibility and efficiency of serum-derived exosome extraction methods. **Clinical Biochemistry**, v. 47, n. 13-14, p. 1286–1292, 2014.

CARNEIRO-PROIETTI AB, CATALAN-SOARES B, P. F. Human T cell lymphotropic viruses (HTLV-I/II) in South America: should it be a public health concern? **J Biomed Sci.**, v. 9, n. 6 Pt 2, p. 587–95., 2002.

CHAAR, V. et al. Effect of strenuous physical exercise on circulating cell-derived microparticles. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 47, n. 1, p. 15–25, 2011.

CHAHAR, H. S.; BAO, X.; CASOLA, A. **Exosomes and their role in the life cycle and pathogenesis of RNA viruses** *Viruses*, 2015. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/viruses>

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, n. 1, p. 255–289, 11 out. 2014.

COOK, L. B. et al. HTLV-1: persistence and pathogenesis. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 131–40, 5 jan. 2013.

COOK, L. B. et al. The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. **Blood**, v. 123, n. 25, p. 3925–31, 19 jun. 2014.

COOK, L. B. M. et al. Rapid dissemination of human T-lymphotropic virus type 1 during primary infection in transplant recipients. **Retrovirology**, v. 13, n. 1, p. 3, 2016.

CROSSLAND, R. E. et al. Evaluation of optimal extracellular vesicle small RNA isolation and qRT-PCR normalisation for serum and urine. **Journal of Immunological Methods**, 2015.

DE CARVALHO, J. V. et al. Nef neutralizes the ability of exosomes from CD4+ T cells to act as decoys during HIV-1 infection. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113691, 2014.

DEATHERAGEA, B. L.; COOKSONA, B. T. **Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: A conserved yet underappreciated aspect of microbial life** *Infection and Immunity*, 2012.

DEHÉE, A. et al. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v. 102, n. 1-2, p. 37–51, 2002.

DONEGAN, E. et al. Transfusion transmission of retroviruses: human T-lymphotropic virus types I and II compared with human immunodeficiency virus type 1. p. 478–483, 1994.

DRAGOVIC, R. A. et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 7, n. 6, p. 780–788, 2011.

DREUX, M. et al. Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. **Cell host & microbe**, v. 12, n. 4, p. 558–70, 18 out. 2012.

DUTTA, S. et al. Circulating exosomes as an enriched source for adult T-cell leukemia biomarkers. **Retrovirology**, v. 12, n. Suppl 1, p. P33, 2015.

ELDH, M. et al. Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA: Evaluation of different methods. **Molecular Immunology**, v. 50, n. 4, p. 278–286, 2012.

FLEMING, A. et al. The carrying pigeons of the cell: exosomes and their role in infectious diseases caused by human pathogens. **Pathogens and disease**, v. 71, n. 2, p. 109–20, jul. 2014.

FRÜHBEIS, C. et al. Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. **PLoS biology**, v. 11, n. 7, p. e1001604, jul. 2013.

FUZII, H. T. et al. Immunopathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Life sciences**, v. 104, n. 1-2, p. 9–14, 28 maio 2014.

GANGODA, L. et al. Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: Are they protective or pathogenic? **Proteomics**, p. 1–37, 11 out. 2014.

GEORGE, N. et al. Isolation of Human Platelet Membrane Microparticles From Plasma and Serum. **Blood**, v. 60, n. 4, p. 834–841, 1982.

GESSAIN, A. et al. ANTIBODIES TO HUMAN T-LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE-I IN PATIENTS WITH TROPICAL SPASTIC PARAPARESIS. **The Lancet**, p. 407–09, 1985.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. **Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection** *Frontiers in Microbiology*, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3498738&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 14 nov. 2014

GHEZ, D. et al. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. **Journal of virology**, v. 80, n. 14, p. 6844–54, jul. 2006.

GOOF, S. Retroviridae: The retroviruses and their Replication Cycle. In: **Virology**. 4. ed. Fields: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.

GOTUZZO E, ARANGO C, DE QUEIROZ-CAMPOS A, I. R. Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 14, n. 1, p. 211–39, 2000.

GROSS, C.; THOMA-KRESS, A. Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. **Viruses**, v. 8, n. 3, p. 74, 2016.

HIEMSTRA, T. F. et al. Human Urinary Exosomes as Innate Immune Effectors. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, p. 1–11, 2014.

HILL, A. F. et al. ISEV position paper: extracellular vesicle RNA analysis and bioinformatics. **Journal of extracellular vesicles**, v. 2, p. 1–8, 2013.

HUANG, X. et al. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. **BMC genomics**, v. 14, p. 319, 2013.

IRACI, N. et al. **Focus on extracellular vesicles: Physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles** *International Journal of Molecular Sciences*, 2016.

IWAI, K. et al. Human T-cell leukemia virus type 1 tax protein activates transcription through AP-1 site by inducing DNA binding activity in T cells. *Virology*, v. 279, n. 1, p. 38–46, 2001.

IWANAGA, M. et al. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood*, v. 116, n. 8, p. 1211–9, 26 ago. 2010.

JAWORSKI, E. et al. Human T-lymphotropic virus type 1-infected cells secrete exosomes that contain tax protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 32, p. 22284–22305, 2014a.

JAWORSKI, E. et al. Human T-lymphotropic virus type 1-infected cells secrete exosomes that contain tax protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 32, p. 22284–22305, 2014b.

JAWORSKI, E. et al. Human T-lymphotropic virus type 1-infected cells secrete exosomes that contain tax protein. *Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 32, p. 22284–22305, 8 ago. 2014c.

JAWORSKI, E. et al. Human T-lymphotropic virus type 1-infected cells secrete exosomes that contain Tax protein. *The Journal of biological chemistry*, v. 289, n. 32, p. 22284–305, 8 ago. 2014d.

JONES, K. S. et al. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nature medicine*, v. 14, n. 4, p. 429–436, 2008.

KALYANARAMAN, V. S. et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science (New York, N.Y.)*, v. 218, n. 4572, p. 571–3, 5 nov. 1982.

KAPLAN, J. et al. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. The Retrovirus Epidemiology Donor Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.*, v. 12, n. 2, p. 193–201, 1996.

KIERULF, B. et al. iMedPub Journals Direct Isolation of Exosomes from Cell Culture : Simplifying Methods for Exosome Enrichment and Analysis Abstract. p. 1–9, 2015.

KIRA, J. I. et al. Increased HTLV-I proviral DNA in HTLV-I-associated myelopathy: A quantitative polymerase chain reaction study. *Annals of Neurology*, v. 29, n. 2, p. 194–201, 1991.

KORKUT, C. et al. Trans-synaptic transmission of vesicular Wnt signals through Evi/Wntless. *Cell*, v. 139, n. 2, p. 393–404, 16 out. 2009.

KRÄMER-ALBERS, E. M. et al. Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons? **Proteomics - Clinical Applications**, v. 1, n. 11, p. 1446–1461, 2007.

LAI, R. C. et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. **Stem Cell Research**, v. 4, n. 3, p. 214–222, maio 2010.

LANE, R. E. et al. Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. **Scientific reports**, v. 5, p. 7639, 2015.

LÄSSER, C. et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. **Journal of translational medicine**, v. 9, n. 1, p. 9, 2011.

LEHKY, T. J. et al. Reduction in HTLV-I proviral load and spontaneous lymphoproliferation in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients treated with humanized anti-Tac. **Annals of Neurology**, v. 44, n. 6, p. 942–947, 1998.

LEMASSON, I. et al. Activation of E2F-mediated Transcription by Human T-cell Leukemia Virus Type I Tax Protein in a p16 INK4A -negative T-cell Line *. **J.Biol.Chem.**, v. 273, n. 36, p. 23598–23604, 1998.

LENASSI, M. et al. HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4+ T cells. **Traffic (Copenhagen, Denmark)**, v. 11, n. 1, p. 110–22, jan. 2010.

LEZIN, A. et al. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral load in cerebrospinal fluid: a new criterion for the diagnosis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? **The Journal of infectious diseases**, v. 191, n. 11, p. 1830–1834, 2005.

LOBB, R. J. et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 1, n. 27031, p. 1–11, 2015.

LOGOZZI, M. et al. High Levels of Exosomes Expressing CD63 and Caveolin- 1 in Plasma of Melanoma Patients. v. 4, n. 4, 2009.

LÖTVALL, J. et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of extracellular vesicles**, v. 1, p. 1–6, 2014.

MADISON, M. N.; ROLLER, R. J.; OKEOMA, C. M. Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity. p. 1–15, 2014.

MAHMOODZADEH HOSSEINI, H. et al. The Role of Exosomes in Infectious Diseases. **Inflammation & Allergy-Drug Targets**, v. 12, n. 1, p. 29–37, 1 jan. 2013.

MALONEY, E. M. et al. **Incidence of HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica and Trinidad**, 1998.

MAZUROV, D. et al. Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 2, 2010.

MECKES, D. G.; RAAB-TRAUB, N. Microvesicles and viral infection. **Journal of virology**, v. 85, n. 24, p. 12844–54, dez. 2011.

MÖBIUS-WINKLER, S. et al. Time-dependent mobilization of circulating progenitor cells during strenuous exercise in healthy individuals. **Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)**, v. 107, n. 6, p. 1943–1950, 2009.

MOMEN-HERAVI, F. et al. **Current methods for the isolation of extracellular vesicles** **Biological Chemistry**, 2013.

NAGAI, M. 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. **Journal of neurovirology**, v. 4, n. 6, p. 586–593, 1998.

NAGAI, M. et al. Increased HTLV-I proviral load and preferential expansion of HTLV-I Tax-specific CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from patients with HAM/TSP. **Ann Neurol.**, v. 50, n. 6, p. 807–812, 2001.

NAGAI, M.; OSAME, M. Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. **Journal of neurovirology**, v. 9, n. 2, p. 228–235, 2003a.

NAGAI, M.; OSAME, M. Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. **Journal of neurovirology**, v. 9, n. 2, p. 228–235, abr. 2003b.

NEJMEDDINE, M. et al. HTLV-1-Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 1016–1025, 2009.

NIEDERER, H. A et al. HTLV-1 proviral integration sites differ between asymptomatic carriers and patients with HAM/TSP. **Virology journal**, v. 11, p. 172, jan. 2014.

PAIS-CORREIA, A.-M. et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. **Nature medicine**, v. 16, n. 1, p. 83–89, 2010.

PANT, S.; HILTON, H.; BURCZYNSKI, M. E. The multifaceted exosome: Biogenesis, role in normal and aberrant cellular function, and frontiers for pharmacological and biomarker opportunities. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 11, p. 1484–1494, 1 jun. 2012.

PEGTEL, D. M.; PEFFEROEN, L.; AMOR, S. Extracellular vesicles as modulators of cell-to-cell communication in the healthy and diseased brain. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 369, n. 1652, 26 set. 2014.

PETERSON, M. F. et al. Integrated systems for exosome investigation. **METHODS**, 2015.

PISITKUN, T.; SHEN, R.-F.; KNEPPER, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 36, p. 13368–13373, 2004.

POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 12, p. 7415–7419, 1 dez. 1980.

PROIETTI, A. B. DE F. C. **HTLV**. 6 ed. ed. Belo Horizonte: Cadernos Hemominas, 2015.

PROOYEN, N. VAN et al. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. **PNAS**, 2010.

QAZI, K. R. et al. Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis. **Thorax**, v. 65, p. 1016–1024, 2010.

RAMAKRISHNAIAH, V. et al. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 32, p. 13109–13113, 2013.

RAPOSO, G. et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 3, p. 1161–72, 1 mar. 1996.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal of cell biology**, v. 200, n. 4, p. 373–83, 18 fev. 2013.

REKKER, K. et al. Comparison of serum exosome isolation methods for microRNA profiling. **Clinical Biochemistry**, v. 47, n. 1-2, p. 135–138, 2014.

ROBBINS, P. D.; MORELLI, A. E. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 3, p. 195–208, mar. 2014.

ROCHA-JÚNIOR, M. C. et al. Interleukin-18 and interferon-gamma polymorphisms are implicated on proviral load and susceptibility to human T-lymphotropic virus type 1 infection. **Tissue antigens**, v. 80, n. 2, p. 143–50, ago. 2012.

SÁENZ-CUESTA, M. et al. Methods for extracellular vesicles isolation in a hospital setting. v. 6, n. February, 2015.

SAITO, M. et al. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Retrovirology**, v. 6, p. 19, jan. 2009.

SEIKI, M. et al. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, p. 3618–3622, 1983.

SIMONS, M.; RAPOSO, G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. **Current opinion in cell biology**, v. 21, n. 4, p. 575–81, ago. 2009.

SJOSTROM, A E. et al. Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. **Sci Rep**, v. 5, p. 15329, 2015.

SKOG, J. et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. **Nat Cell Biol.**, v. 10, n. 12, p. 1470–1476, 2012.

SUZUKI, T.; UCHIDA-TOITA, M.; YOSHIDA, M. Tax protein of HTLV-1 inhibits CBP/p300-mediated transcription by interfering with recruitment of CBP/p300 onto DNA element of E-box or p53 binding site. **Oncogene**, v. 18, n. 28, p. 4137–43, 1999.

TATTERMUSCH, S. et al. Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 1, p. e1002480, jan. 2012.

TAYLOR, G. P. et al. Prospective Study of HTLV-1 Infection in an Initially Asymptomatic Cohort. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, p. 92–100, 1999.

THÉBAULT, S. et al. HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. **FEBS letters**, v. 562, n. 1-3, p. 165–70, 26 mar. 2004.

THÉRY, C. et al. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants. **Current Protocols in Cell Biology**, p. 1–29, 2006.

THÉRY, C.; OSTROWSKI, M.; SEGURA, E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 8, p. 581–93, ago. 2009.

TOSSWILL, J. H. C. et al. Quantification of proviral DNA load in human T-cell leukaemia virus type I infections. **Journal of Virological Methods**, v. 75, n. 1, p. 21–26, 1998.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 654–659, 2007.

VINCENT-SCHNEIDER, H. et al. Exosomes bearing HLA-DR1 molecules need dendritic cells to efficiently stimulate specific T cells. **International immunology**, v. 14, n. 7, p. 713–722, 2002.

VRIELINK, H.; REESINK, H. W. HTLV-I/II prevalence in different geographic locations. **Transfusion medicine reviews**, v. 18, n. 1, p. 46–57, jan. 2004.

WANG, S. et al. Synapsin I Is an Oligomannose-Carrying Glycoprotein, Acts As an Oligomannose-Binding Lectin, and Promotes Neurite Outgrowth and Neuronal Survival When Released via Glia-Derived Exosomes. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 20, p. 7275–7290, 2011.

WITWER, K. W. et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research '. v. 1, p. 1–25, 2013a.

WITWER, K. W. et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **Journal of extracellular vesicles**, v. 2, p. 1–25, 2013b.

WOLFE, N. D. et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 22, p. 7994–9, 31 maio 2005.

WURDINGER, T. et al. Extracellular Vesicles and Their Convergence with Viral Pathways. **Advances in Virology**, v. 2012, n. 1, p. 767694, jan. 2012.

XIAO, G. et al. Retroviral oncoprotein tax induces processing of NF- κ B2/p100 in T cells: Evidence for the involvement of IKK α . **EMBO Journal**, v. 20, n. 23, p. 6805–6815, 2001.

YAMANO, Y.; SATO, T. Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Frontiers in microbiology**, v. 3, n. November, p. 389, jan. 2012.

YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. v. 4, p. 27066, 2015.

YOSHIDA, M. et al. Increased replication of HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy. **Annals of Neurology**, v. 26, n. 3, p. 331–335, 1989.

ZHOU, Q. et al. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. **International Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 1, p. 118–123, 2011.

ZHUANG, X. et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 19, n. 10, p. 1769–79, 2011.

Apêndice A. Moda do tamanho das partículas (em nanômetros) isoladas do soro por ultracentrifugação e precipitação polimérica.

Amostra	Moda do tamanho (nm)	
	Ultracentrifugação	Exoquick TM *
CT 17	122,8 ± 6,0	124,1 ± 5,1
CT 19	121,2 ± 12,8	111,4 ± 6,0
CT 22	104,1 ± 5,1	95,8 ± 6,9
Média	116,03 ± 7,96	110,43 ± 6,0

* kit de precipitação polimérica (*System Biosciences*)

CT: indivíduos sadios.

Apêndice B. Concentração das partículas/mL isoladas do soro por ultracentrifugação e precipitação polimérica.

Amostra	Concentração (partículas/mL)	
	Ultracentrifugação	Exoquick™*
CT 17	$4,5 \times 10^8 \pm 1,59 \times 10^7$	$9,34 \times 10^8 \pm 1,57 \times 10^7$
CT 19	$1,66 \times 10^8 \pm 1,88 \times 10^7$	$10,1 \times 10^8 \pm 5,54 \times 10^7$
CT 22	$1,41 \times 10^8 \pm 1,09 \times 10^7$	$6,47 \times 10^8 \pm 2,74 \times 10^7$
Média	$2,52 \times 10^8 \pm 3,04 \times 10^7$	$8,64 \times 10^8 \pm 3,69 \times 10^7$

* kit de precipitação polimérica (*System Biosciences*)

CT: indivíduos sadios.

Apêndice C. Moda do tamanho das partículas em nanômetros (nm) entre os diferentes grupos clínicos estudados.

Amostra	Moda do tamanho (nm)	Média (nm)
CT 17	124,1 ± 5,1	116,98 +/- 5,53
CT 19	111,4 ± 6,0	
CT 20	121,7 ± 5,8	
CT 21	142,3 ± 7,6	
CT 22	95,8 ± 6,9	
CT 23	106,6 ± 1,8	
HAC 07	107,6 ± 3,2	127,15 ± 6,08
HAC 17	129,7 ± 12,0	
HAC 20	118,5 ± 6,1	
HAC 22	173,4 ± 8,2	
HAC 24	102,4 ± 5,2	
HAC 25	131,3 ± 1,8	
HAM/TSP 10	130,4 ± 8,1	126,63 ± 6,15
HAM/TSP 18	105,8 ± 1,7	
HAM/TSP 21	108,0 ± 6,8	
HAM/TSP 23	140,7 ± 4,4	
HAM/TSP 27	143,6 ± 11,7	
HAM/TSP 28	131,3 ± 4,2	

CT: indivíduos sadios. HAC: indivíduos assintomáticos. HAM/TSP: indivíduos sintomáticos.

Apêndice D. Concentração das partículas/ml de soro entre os diferentes grupos clínicos estudados.

Amostra	Concentração (partículas/mL)	Média (partículas/mL)
CT 17	$0,93 \times 10^9 \pm 1,57 \times 10^7$	$0,91 \times 10^9 \pm 3,42 \times 10^7$
CT 19	$1,01 \times 10^9 \pm 5,54 \times 10^7$	
CT 20	$0,81 \times 10^9 \pm 4,91 \times 10^7$	
CT 21	$0,47 \times 10^9 \pm 1,48 \times 10^7$	
CT 22	$0,65 \times 10^9 \pm 2,74 \times 10^7$	
CT 23	$1,57 \times 10^9 \pm 4,26 \times 10^7$	
HAC 07	$0,30 \times 10^9 \pm 1,57 \times 10^7$	$1,39 \times 10^9 \pm 7,69 \times 10^7$
HAC 17	$2,34 \times 10^9 \pm 18,6 \times 10^7$	
HAC 20	$0,90 \times 10^9 \pm 2,17 \times 10^7$	
HAC 22	$1,30 \times 10^9 \pm 11,6 \times 10^7$	
HAC 24	$2,86 \times 10^9 \pm 5,06 \times 10^7$	
HAC 25	$0,67 \times 10^9 \pm 7,14 \times 10^7$	
HAM/TSP 10	$1,06 \times 10^9 \pm 4,64 \times 10^7$	$1,50 \times 10^9 \pm 6,63 \times 10^7$
HAM/TSP 18	$0,82 \times 10^9 \pm 5,51 \times 10^7$	
HAM/TSP 21	$2,59 \times 10^9 \pm 5,75 \times 10^7$	
HAM/TSP 23	$1,48 \times 10^9 \pm 5,76 \times 10^7$	
HAM/TSP 27	$2,37 \times 10^9 \pm 11,0 \times 10^7$	
HAM/TSP 28	$0,69 \times 10^9 \pm 7,13 \times 10^7$	

CT: indivíduos sadios. HAC: indivíduos assintomáticos. HAM/TSP: indivíduos sintomáticos.

Apêndice E. Concentração do RNA exossomal e relação 28S/18S avaliados por *Bioanalyzer*.

Amostra	Concentração (ng/μL)	Relação RNAr 28S/18S
CT 17	26	0,6
CT 20	19	0
CT 22	18	0
HAC 17	16,7	0
HAC 22	21,5	0
HAC 24	26,4	0
HAM/TSP 10	25	0
HAM/TSP 21	17,4	0
HAM/TSP 23	37,7	0
HAM/TSP 27	30,9	0
MT-2	30	2,2

CT: indivíduos sadios. HAC: indivíduos assintomáticos. HAM/TSP: indivíduos sintomáticos.

Apêndice F. Valores da média do Ct para os genes virais *tax* e *HBZ* e endógeno *β -actina* nas amostras exossomais derivadas do soro avaliados por PCR em tempo real.

Amostra	Ct <i>tax</i>	Ct <i>HBZ</i>	Ct <i>β-actina</i>
CT 17	—	—	32,71
CT 19	—	—	32,81
CT 20	—	—	33,63
CT 21	—	—	33,24
CT 22	—	—	31,64
CT 23	—	—	31,37
Média			32,57
HAC 07	—	—	33,77
HAC 17	—	—	32,71
HAC 20	—	—	32,52
HAC 22	—	—	36,17
HAC 24	—	—	32,15
HAC 25	—	—	33,01
Média			33,39
HAM/TSP 10	36,97	36,36	33,79
HAM/TSP 18	36,14	37,26	33,31
HAM/TSP 21	—	36,97	31,32
HAM/TSP 23	35,58	35,09	32,28
HAM/TSP 27	37,05	37,57	33,70
HAM/TSP 28	—	—	32,07
Média	36,44	36,65	32,75

CT: indivíduos sadios. HAC: indivíduos assintomáticos. HAM/TSP: indivíduos sintomáticos.

ANEXO I- Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 13 de maio de 2015.

Ofício nº 1741/2015
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 3437/2015

Prezadas Pesquisadoras,

O trabalho intitulado **“ESTUDO DE EXOSSOMOS NA INFECÇÃO PELO HTLV-1” – Versão 2 de 26/03/2015**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 407ª Reunião Ordinária realizada em 11/05/2015, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 de 26/03/2015.**

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras

PROFª DRª SIMONE KASHIMA HADDAD

Pesquisadores responsáveis: Katia Kaori Otaguiri/Suellen G. Salustiano
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FNA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil (CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO II- Termo de Consentimento livre e esclarecido dos controles

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- Campus Universitário Monte Alegre
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Grupo Controle**

NOME DA PESQUISA: “ESTUDO DE EXOSSOMOS NA INFECÇÃO PELO HTLV-1”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Simone Kashima Haddad, Suellen Gomes Salustiano, Kátia Kaori Otaguiri, Dimas Tadeu Covas

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa desenvolvida pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP-RP, em conjunto com os pesquisadores do Centro de Terapia Celular- Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV).

A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento e após a assinatura, receberá uma outra via do mesmo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas pelo participante e pesquisador.

Caso seja de seu interesse, você, participante, poderá ter acesso aos resultados dessa pesquisa. Para saber o resultado, ou caso você tenha qualquer outra dúvida, entrar em contato nos telefones abaixo.

Caso a amostra seja identificada como positiva para outras doenças infecciosas, o médico responsável será notificado para prosseguir com os cuidados específicos.

O que é HTLV?

O HTLV (vírus linfotrópico de células T humanas) é um retrovírus que infecta a célula T humana que é importante para o sistema de defesa do organismo.

Como ele é transmitido?

O HTLV é transmitido por via sexual (relações sexuais desprotegidas), pelo sangue (transusão) e da mãe infectada para o filho (principalmente pelo aleitamento materno).

O que ele causa?

A maioria dos indivíduos não apresenta sintomas, porém uma pequena parcela das pessoas infectadas pode ter uma doença com alteração nos nervos (doenças neurológicas) ou no sangue (doenças hematológicas).

Como você, participante, vai contribuir com esta pesquisa?

A realização desta coleta de sangue de pessoas que NÃO estejam contaminadas com este vírus será importante para utilizar como controle negativo para esta pesquisa. A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 05mL de sangue (o equivalente à uma colher de chá) e esta será realizada por um profissional experiente e capacitado. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. Poderá haver um leve desconforto durante o procedimento e os riscos que podem ocorrer são a formação de hematomas (manchas roxas na pele) no local de punção e sensação dolorosa. Após a coleta, a amostra de sangue será direcionada para o laboratório de pesquisa para estudar como ocorre o desenvolvimento da doença causada pelo vírus HTLV.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

Sabe-se que algumas partículas esféricas, que são liberadas por células infectadas, estão envolvidas no desenvolvimento de várias doenças e podem estar associadas também ao desenvolvimento da doença que acomete os nervos causada pelo HTLV. Esta pesquisa proporcionará melhor entendimento da função destas partículas na infecção pelo HTLV-1.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Afirmamos que os nomes dos pacientes não serão divulgados em nenhum momento. Esta pesquisa não trará benefício direto ao sujeito envolvido, mas poderá ajudar a esclarecer como ocorre o desenvolvimento dessa doença, bem como auxiliar no diagnóstico/prognóstico, ficando a critério do mesmo a desistência em participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ao seu seguimento hospitalar.

Para saber o resultado desta pesquisa, ou caso você tenha qualquer outra dúvida, entrar em contato com Kátia Kaori Otaguiri, Suellen Gomes Salustiano ou Simone Kashima Haddad pelo telefone (16) 2101 9300 ramal 9606. Para dúvidas éticas, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo telefone (16) 3602-2228.

() Sim, eu concordo em participar do estudo e autorizo a coleta de 05mL de meu sangue através da punção venosa para a realização da pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará danos à minha saúde. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é de entender como o vírus se comporta e promove o aparecimento das infecções.

_____ Nome do participante (datilografado ou em letra de fôrma)	_____ Assinatura do participante	_____ Data
_____ Nome do pesquisador que aplicou o TCLE(datilografado ou em letra de fôrma)	_____ Assinatura do pesquisador que aplicou o TCLE	_____ Data

ANEXO III- Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO- Campus Universitário Monte Alegre
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
HEMOCENTRO DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: “ESTUDO DE EXOSSOMOS NA INFECÇÃO PELO HTLV-1”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Simone Kashima Haddad, Kátia Kaori Otaguiri, Suellen Gomes Salustiano, Dimas Tadeu Covas

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa desenvolvida pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP-RP, em conjunto com os pesquisadores do Centro de Terapia Celular- Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV).

A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento e após a assinatura, receberá uma outra via do mesmo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas pelo participante e pesquisador.

Caso seja de seu interesse, você, participante, poderá ter acesso aos resultados dessa pesquisa. Para saber o resultado, ou caso você tenha qualquer outra dúvida, entrar em contato nos telefones abaixo.

Caso a amostra seja identificada como positiva para outras doenças infecciosas, o médico responsável será notificado para prosseguir com os cuidados específicos.

O que é HTLV?

O *HTLV* (vírus linfotrópico de células T humanas) é um retrovírus que infecta a célula T humana que é importante para o sistema de defesa do organismo.

Como ele é transmitido?

O HTLVé transmitido por via sexual (relações sexuais desprotegidas), pelo sangue (transusão, compartilhamento de materiais contaminados) e da mãe infectada para o filho (principalmente pelo aleitamento materno).

O que ele causa?

A maioria dos indivíduos não apresenta nenhum sintoma, porém algumas pessoas infectadas podem ter uma doença com alteração nos nervos (por exemplo, dificuldade de andar) ou no sangue.

Como você, paciente, vai participar da pesquisa?

No que se refere à coleta do sangue necessário para pesquisa, esta será realizada por um profissional experiente e capacitado, que colherá 05mL de sangue (o equivalente à uma colher de chá). Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. Poderá haver um leve desconforto durante o procedimento e os riscos que podem ocorrer são a formação de hematomas (manchas roxas na pele) no local de punção e sensação dolorosa. Após a coleta, a amostra de sangue será direcionada para o laboratório de pesquisa para estudar como ocorre o desenvolvimento da doença causada pelo vírus HTLV.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

Sabe-se que algumas partículas esféricas, que são liberadas por células infectadas, estão envolvidas no desenvolvimento de várias doenças e podem estar associadas também ao desenvolvimento da doença que acomete os nervos causada pelo HTLV. Esta pesquisa proporcionará melhor entendimento da função destas partículas na infecção pelo HTLV-1.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Afirmamos que os nomes dos pacientes não serão divulgados em nenhum momento. Esta pesquisa não trará benefício direto ao sujeito envolvido, mas poderá ajudar a esclarecer como ocorre o desenvolvimento dessa doença, bem como auxiliar no diagnóstico/prognóstico, ficando a critério do mesmo a desistência em participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ao seu seguimento hospitalar.

Para saber o resultado desta pesquisa, ou caso você tenha qualquer outra dúvida, entrar em contato com Kátia Kaori Otaguiri, Suellen Gomes Salustiano ou Simone Kashima Haddad pelo telefone (16) 2101 9300 ramal 9606. Para dúvidas éticas, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo telefone (16) 3602-2228.

() Sim, eu concordo em participar do estudo e autorizo a coleta de 05mL de meu sangue através da punção venosa para a realização da pesquisa. Fui informado (a) sobre o

procedimento e que o volume retirado não causará danos à minha saúde. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é de entender como o vírus se comporta e promove o aparecimento das infecções.

Nome do participante (datilografado ou em letra de fôrma)	Assinatura do participante	Data
--	----------------------------	------

Nome do pesquisador que aplicou o TCLE(datilografado ou em letra de fôrma)	Assinatura do pesquisador que aplicou o TCLE	Data
--	---	------