UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do efeito imunomodulador das células
mesenquimais estromais humanas em linfócitos T infectados
pelo HTLV-1**

Evandra Strazza Rodrigues Sandoval

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do efeito imunomodulador das células mesenquimais
estromais humanas em linfócitos T infectados pelo HTLV-1**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

**Orientada: Evandra Strazza
Rodrigues Sandoval**

**Orientadora: Profa. Dra. Simone
Kashima Haddad**

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP em 07/10/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2014

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rodrigues-Sandoval, Evandra Strazza

Avaliação do efeito imunomodulador das células mesenquimais estromais humanas em linfócitos T infectados pelo HTLV-1. Ribeirão Preto, 2014.

140 p. : il. ; 30cm.

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

Orientadora: Kashima, Simone.

1. MSC. 2. HTLV-1. 3. Imunorregulação. 4. Diferenciação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Evandra Strazza Rodrigues Sandoval

Título do trabalho: Avaliação do efeito imunomodulador das células mesenquimais estromais humanas em linfócitos T infectados pelo HTLV-1

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Simone Kashima Haddad

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Evani e Gumercindo, com amor e imensa gratidão e ao meu querido marido Matheus Eugênio Fernandes Sandoval

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por iluminar e conduzir meus passos com fé e sabedoria em todos os momentos;

Aos meus pais Gumercindo e Evani, pelo exemplo de amor, fé, dedicação, honestidade e educação que sempre me foram dados. A base é o começo de tudo, então o que eu sou hoje devo aos meus pais. Obrigada pelos seus ensinamentos, o carinho e o incentivo desde o início da minha carreira. Vocês são os pilares de minha vida. Amo muito vocês dois;

Ao meu marido Matheus Sandoval, que sempre esteve ao meu lado e me incentivou nas horas difíceis, com força, amor, companheirismo e paciência. Obrigada por poder compartilhar cada momento da minha vida com você, exigindo o melhor de mim e me incentivando a dar um passo maior. Amo você;

Ao meu querido irmão Gumercindo Júnior e a Cris, pelo carinho, incentivo, e aconselhamentos, enfim pela nossa amizade e cumplicidade e por tudo o mais que vocês fazem por mim;

À minha querida orientadora Profa. Dra. Simone Kashima Haddad, exemplo de profissionalismo, competência, dedicação e sabedoria. Agradeço imensamente aos seus ensinamentos que enriqueceram meu conhecimento científico e pessoal. Muito obrigada pela oportunidade, pela confiança em mim depositada e pela sua inestimável amizade;

Ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, pelo apoio, oportunidade e viabilização de todos os experimentos realizados na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

À minha querida prima Rosângela Calhau Rodrigues, um exemplo de amor e dedicação com a família e com seus alunos. Obrigada pelo carinho e apoio que muito contribuíram para minha realização profissional e pessoal.

Ao Sr. Carlos Eduardo Sandoval e Martha R. Fernandes Sandoval, obrigada pelo apoio nas dificuldades e alegrias. Agradeço também a Mara, Fifa, Miguel, Karen e Ricardo pelo carinho e força que sempre me deram.

Aos pacientes com HTLV-1 e doadores saudáveis que gentilmente cederam amostras de sangue e de medula óssea para realização deste trabalho.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular: Aline F. Ferreira, Aline C. Romagnole, Alexander Ferreira, Daiane F. dos Santos, Fernanda Ursoli F. de Melo, Isabela Gerdes, Katia Kaori Otaguiri, Lucas Catelli, Mayra Dorigan de Macedo, Maurício C. Rocha-Junior, Mariana Tomazini Pinto, Péricles, Svetoslav N. Slavov, Suelen Salustiano, Talitha Cutter, Tathiane M. Malta Pereira e Virgínia M.D. Wagatsuma. Agradeço pela amizade, incentivo, apoio científico, ajuda com os experimentos e pelos inúmeros momentos de alegria e descontração que passamos juntos.

À minha amiga Rochele Azevedo França, obrigada pelo carinho, pelas conversas, conselhos e ensinamentos que muito contribuíram para minha formação.

À Dra. Maria do Carmo Favarin, pelo exemplo de profissionalismo, sempre atendendo com gentileza, cuidado e atenção todos os pacientes e funcionários desta instituição. Muito obrigada pela fundamental ajuda na coleta das amostras de medula óssea.

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto. Agradeço a Patrícia V. Bonini Palma, Camila C. O. Menezes e Danielle Aparecida Rosa de Magalhães pela atenção e disponibilidade nas análises de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência realizada neste trabalho.

Ao Laboratório de Sorologia do Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo carinho e atenção na realização dos ensaios imunoenzimáticos.

Ao Laboratório de Cultura Celular, especialmente a Dra. Maristela Delgado Orellana e a Sâmia R. Caruso que gentilmente contribuíram para realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Imunologia Celular especialmente a Profa. Dra. Kellen C. R. Malmegrim de Faria pelo apoio científico e as amigas Gislane Lelis Vilela de Oliveira e Julia Teixeira Cottas de Azevedo pela amizade e contribuição na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas, em especial a Amélia Araújo pela laboriosa realização das técnicas de *microarrays*.

Ao Laboratório de Bioinformática do Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial ao Prof. Wilson Araújo da Silva Junior, Jessica Rodrigues Praça e Adriana Marques pela ajuda nas análises dos dados de *microarrays* e sequenciamento de DNA.

À Carmen Oliva Simão, Elaine Teresinha Faria de Sousa, Renata M. Zequim Bertollazzi, Renata Kurukava e Dalva Tereza Catto, pela amizade, disponibilidade e atenção com que sempre me atenderam.

À Sandra Navarro Bresciani pela arte gráfica na realização das ilustrações e à Fernanda Udinal e Florência pela disponibilidade e ajuda na tradução dos textos.

Ao Dr. Leonardo Lira do Amaral pela sua assistência na irradiação das células MT-2 e a Josiane Serrano Borges pelo apoio nos ensaios imunohistoquímicos.

A todos os funcionários da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e secretaria de pós-graduação pela atenção e serviços prestados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 477126/2009-0 pelo apoio financeiro e científico.

Em suma, agradeço imensamente a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desta importante etapa da minha vida.

“O ato de ver não é coisa natural. Precisa ser aprendido.”

Rubem Alves

RESUMO

Rodrigues, E.S. **Avaliação do efeito imunomodulador das células mesenquimais estromais humanas em linfócitos T infectados pelo HTLV-1.** 2014. 138f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

As características das células estromais mesenquimais multipotentes (MSC) podem ser influenciadas em microambientes inflamatórios. No entanto, o comportamento das MSC frente às infecções virais e a exata contribuição da infecção para disfunção das MSC continuam a ser elucidadas. Neste trabalho, avaliamos o efeito imunossupressor de MSC em linfócitos T infectados pelo HTLV-1 e a susceptibilidade da MSC à infecção por este retrovírus. Os ensaios de co-cultivo utilizando MSC e linhagens de linfócitos infectados pelo HTLV-1 resultaram em diminuição na expressão do gene viral *tax* e do antígeno p19 do HTLV-1. A redução na expressão do gene *tax* e da proteína p19 foi relacionada com a maior secreção de IL-6 e aumento na expressão dos genes PGE2, IDO e VCAM-1. Para confirmar a influência da imunorregulação das MSC sobre linfócitos T infectados, comparamos a proliferação de linfócitos T isolados de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e indivíduos controles cultivados na presença de MSC. Foi observado que as MSC inibem a linfoproliferação de forma similar em amostras controle e na infecção pelo HTLV-1; e este efeito foi mediado pela expressão de PGE2 e IDO. Além disso, a expressão do gene *pol* e da proteína p19 do HTLV-1 foi menor após o co-cultivo com MSC, indicando que a imunorregulação pelas MSC também atua nas células infectadas pelo HTLV-1. Em seguida, para investigar as alterações provocadas pelo HTLV-1 nas MSC, realizamos análises morfológicas e ultraestruturais em MSC expostas ao HTLV-1 *in vitro*. Os resultados revelaram que o HTLV-1 induziu o aparecimento de vesículas intracelulares e a expressão das moléculas de superfície VCAM-1, ICAM-1 e HLA-DR. Os níveis de VCAM-1 e HLA-DR também foram mais expressos em MSC cultivadas na presença de PBMC isoladas de indivíduos HAM/TSP. O HTLV-1 não alterou o processo de diferenciação das MSC em osteócitos e adipócitos. No entanto, o contato direto *in vitro* das MSC com células infectadas pelo HTLV-1 proporcionou uma eficiente infecção das MSC. As partículas virais isentas de células não foram capazes de causar a infecção em MSC. Por fim, para certificar a existência biológica de MSC infectadas pelo HTLV-1, avaliamos a medula óssea de seis indivíduos acometidos por esta infecção. Foi observado um infiltrado de linfócitos T CD4⁺ na medula óssea de indivíduos HTLV-1⁺ e a análise do DNA proviral revelou a presença do provírus integrado nessas células T CD4⁺. O número de unidades formadoras de colônia fibroblastóide (CFU-F) foi menor em indivíduos infectados pelo HTLV-1 quando comparado com o grupo controle. A expressão dos marcadores de superfície e o potencial de diferenciação *in vitro* em adipócitos e osteócitos foram similares nas MSC obtidas de indivíduos HTLV-1 e indivíduos controle. Foi demonstrada a presença do DNA proviral e da proteína p19 do HTLV-1 nas MSC isoladas de pacientes HTLV-1⁺. A comparação do perfil de expressão gênica global entre MSC isoladas de HAM/TSP e indivíduos assintomáticos para o HTLV-1 revelou que os genes da catepsina B e da proteína ribossomal L10 foram diferencialmente expressos. Em conclusão, este trabalho demonstra a importância das MSC na imunomodulação de linfócitos infectados pelo HTLV-1 e que a infecção pelo HTLV-1 altera características biológicas das MSC.

Palavras-chave: MSC, HTLV-1, imunorregulação, expressão gênica, diferenciação.

ABSTRACT

Rodrigues, E.S. **Evaluation of the immunomodulatory properties of human mesenchymal stromal cells on HTLV-1 infected T lymphocytes.** 2014. 138f. PhD Thesis. Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

The characteristics of human multipotent mesenchymal stromal cells (MSC) can be influenced by the inflammatory microenvironment. However, the activity of the MSC against viral infections and the exact contribution of the infection to MSC dysfunction remain to be elucidated. We evaluated the immunosuppressive effect of MSC on HTLV-1 infected T lymphocytes and the susceptibility of MSC for this retroviral infection. Assays using co-culture of MSC and HTLV-1⁺ T lymphocyte lineages resulted in a decrease of *tax* gene expression and HTLV-1 p19 antigen. The reduction of the *tax* gene expression and the HTLV-1 p19 were associated with increased IL-6 secretion and higher PGE2, IDO and VCAM-1 gene expression. To confirm if MSC immunoregulation can influence the proliferation of HTLV-1 infected T lymphocytes, we compared the proliferation of HTLV-1⁺ individuals and healthy individuals cultured in the presence of MSC. It was observed that the lymphoproliferative inhibition by MSC in infected lymphocytes was similar to the control cells, and this effect was mediated by the expression of IDO and PGE2 genes. Furthermore, the *pol* gene and the HTLV-1 p19 protein were less expressed after co-culture assay with MSC, suggesting that the immunoregulation by MSC is effective in HTLV-1 infected T cells. In order to investigate the changes caused by HTLV-1 in MSC, we performed morphological and ultrastructural analysis of MSC exposed to HTLV-1 *in vitro*. The contact with HTLV-1 induced an increase of the intracellular vesicles, in addition the MSC cell surface molecules VCAM-1, ICAM-1 and HLA-DR were upregulated. The expression levels of VCAM-1 and HLA-DR molecules were increased in MSC cultured in the presence of PBMC isolated from HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) individuals. The MSC differentiation process into osteocytes and adipocytes was not impaired by HTLV-1. In addition, MSCs were efficiently infected by HTLV-1 *in vitro* due to the direct contact with the HTLV-1-infected cells. However, cell-free virus particles were not capable of causing productive infection. Finally, to ensure the biological function of MSC in HTLV-1 infected patients, we investigated bone marrow (BM) cells from HTLV-1 asymptomatic carriers (HAC) and HAM/TSP individuals. Initially, we observed an infiltration of CD4⁺ T-cell lymphocytes in BM from HTLV-1 infected individuals and the detection of provirus revealed HTLV-1 integration. The number of colonies of fibroblast progenitor cells (CFU-F) was lower in HTLV-1 infected individuals compared to control. HTLV-1 MSC isolated showed surface molecules expression and differentiation into adipogenic and osteogenic cells similar to control MSC. Proviral DNA and HTLV-1 p19 protein were detected in MSC from HTLV-1 patients. The comparison of global gene expression profiles between MSC isolated from HAM/TSP and HAC individuals revealed that cathepsin B and ribosomal protein L10 were differentially expressed. In conclusion, this study suggests the importance of MSC immunomodulation on HTLV-1 infected T lymphocytes and describe that HTLV-1 infects and alters the biological characteristics of MSC.

Keywords: MSC, HTLV-1, immunoregulation, gene expression, differentiation.

RESUMEN

Rodrigues, E.S. **Evaluación del efecto inmunomodulador de las células mesenquimales estromales humanas en linfocitos T infectados por el HTLV-1.** 2014. 138f. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Las características de células multipotentes mesenquimales estromales humanas (MSC) pueden ser influenciadas en microambientes inflamatorios. Sin embargo, el comportamiento de las MSC frente a infecciones virales y la exacta contribución de la infección en la disfunción de las MSC continúan siendo elucidadas. En este trabajo, evaluamos el efecto inmunosupresor de MSC en linfocitos T infectados por el HTLV-1 y la susceptibilidad de la MSC a la infección por este retrovirus. Los ensayos de cocultivo utilizando MSC y linajes de linfocitos infectados por el HTLV-1 resultaron en disminución en la expresión del gen viral *tax* y del antígeno p19 del HTLV-1. La reducción en la expresión del gen *tax* y de la proteína p19 fue relacionada con la mayor secreción de IL-6 y un aumento en la expresión de los genes PGE2, IDO y VCAM-1. Para confirmar la influencia de la inmunorregulación de las MSC sobre linfocitos T infectados, comparamos la proliferación de linfocitos T aislados de individuos infectados por el HTLV-1 e individuos controles cultivados en presencia de MSC. Fue observado, que las MSC inhiben la linfoproliferación de forma similar en muestras control y en la infección por el HTLV-1, y este efecto fue mediado por la expresión de PGE2 e IDO. Además de eso, la expresión del gen *pol* y de la proteína p19 del HTLV-1 fue menor después del cocultivo con MSC, indicando que la inmunorregulación por MSC también es eficaz en células infectadas por el HTLV-1. A continuación, para investigar las alteraciones provocadas por el HTLV-1 en las MSC, realizamos análisis morfológicos y ultra estructurales en MSC expuestas al HTLV-1 *in vitro*. Los resultados revelaron que el HTLV-1 indujo la aparición de vesículas intracelulares y la expresión de las moléculas de superficie VCAM-1, ICAM-1 y HLA-DR. Los niveles de VCAM-1 y HLA-DR también fueron más expresados en MSC cultivadas en presencia de PBMC aisladas de individuos HAM/TSP. El HTLV-1 no perjudicó el proceso de diferenciación de las MSC en osteocitos y adipocitos. Sin embargo, el contacto directo *in vitro* de las MSC con células infectadas por el HTLV-1 proporcionó una infección eficiente de las MSC. Partículas virales libres de células no fueron capaces de causar la infección en MSC. Finalmente, para certificar la existencia biológica de MSC infectadas por el HTLV-1, evaluamos la medula ósea de seis individuos acometidos por esta infección. Fue observado un infiltrado de linfocitos T CD4⁺ en la médula ósea de individuos HTLV-1⁺, y el análisis del DNA proviral reveló la presencia del provirus integrado en estas células T CD4⁺. El número de unidades formadoras de colonia fibroblastoide (CFU-F) fue menor en individuos infectados por el HTLV-1 cuando comparado con el grupo control. La expresión de los marcadores de superficie y el potencial de diferenciación *in vitro* en adipocitos y osteocitos fueron similares en las MSC obtenidas de individuos HTLV-1 e individuos control. Fue demostrada la presencia de DNA proviral e de la proteína p19 del HTLV-1 en las MSC aisladas de pacientes HTLV-1⁺. La comparación del perfil de expresión génica global entre MSC aisladas de HAM/TSP e individuos asintomáticos para el HTLV-1 reveló que los genes de la catepsina B y de la proteína ribosomal L10 fueron diferencialmente expresados. En conclusión, este trabajo demuestra la importancia de las MSC en la inmunomodulación de linfocitos infectados por el HTLV-1 y que la infección por el HTLV-1 altera las características biológicas de las MSC.

Palabras clave: MSC, HTLV-1, inmunoregulación, expresión génica, diferenciación.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Infecções virais no microambiente da medula óssea	10
Figura 2. Estrutura do HTLV-1	12
Figura 3. Representação dos principais fatos históricos relacionados à descoberta dos tipos virais do HTLV, descrição das manifestações clínicas e alvos celulares dessa infecção	14
Figura 4. Fluxograma das etapas experimentais deste trabalho	22
Figura 5. Plasticidade das MSC isoladas da medula óssea de indivíduos controles	24
Figura 6. Expressão do mRNA do gene <i>tax</i> do HTLV-1	45
Figura 7. Detecção do antígeno p19 do HTLV-1 por ELISA	46
Figura 8. Expressão de interleucina 6 (IL-6).....	47
Figura 9. Expressão do mRNA de genes relacionados com a imunorregulação pelas MSC.....	48
Figura 10. Análise da proliferação de células T utilizando diferentes proporções de células.....	49
Figura 11. Análise da proliferação de linfócitos T em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e em indivíduos controles.....	50
Figura 12. Expressão do mRNA de genes relacionados com a imunorregulação pelas MSC.....	51
Figura 13. Expressão de gene <i>pol</i> do HTLV-1.....	52
Figura 14. Detecção do antígeno p19 do HTLV-1 por ELISA em PBMC co-cultivadas com MSC.....	52
Figura 15. Caracterização das MSC expostas ao HTLV-1.....	54
Figura 16. Efeito do HTLV-1 na expressão de moléculas de superfície das MSC.....	55
Figura 17. Perfil imunofenotípico das MSC co-cultivadas com PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1.....	56
Figura 18. Diferenciação adipogênica e osteogênica das MSC expostas ao HTLV-1..	58
Figura 19. Expressão de genes considerados receptores para o HTLV-1 em diferentes tipos celulares	59
Figura 20. Infecção <i>in vitro</i> por HTLV-1 em MSC	61
Figura 21. Análise das células mononucleares da medula óssea (BM-MNC) de indivíduos controles e indivíduos infectados pelo HTLV-1	62
Figura 22. Detecção do HTLV-1 em células T CD4 ⁺ da MO	63
Figura 23. Caracterização morfológica de MSC isoladas de indivíduos controles e indivíduos com HTLV-1	64
Figura 24. Caracterização imunofenotípica e plasticidade celular das MSC isoladas de indivíduos controles e de indivíduos infectados pelo HTLV-1.....	66
Figura 25. Detecção de HTLV-1 por PCR em MSC isoladas de indivíduos HTLV-1 ⁺	67
Figura 26. Análise por PCR em tempo real das MSC obtidas de indivíduos HTLV-1 ⁺ celulares.....	68
Figura 27. Detecção da carga proviral para HTLV-1 em amostras de MSC obtidas de indivíduos infectados pelo HTLV-1	69

Figura 28. Expressão da proteína TAX nas MSC isoladas de indivíduos infectados com HTLV-1	70
Figura 29. Análise da expressão da proteína <i>p19</i> do HTLV-1 por microscopia confocal..	71
Figura 30. Detecção do antígeno p19 do HTLV-1 por ELISA em MSC.....	72
Figura 31. Detecção do HTLV-1 em amostras de linfócitos T co-cultivadas com MSC obtidas de indivíduos HTLV-1 ⁺	73
Figura 32. Normalização dos dados de <i>microarray</i>	74
Figura 33. Agrupamento hierárquico das MSC isoladas de indivíduos HTLV-1 ⁺ com HTLV-1	75
Figura 34. Análise dos genes diferencialmente expressos entre a comparação MSC HAC VS. MSC HAM/TSP.....	76
Figura 35. Suposto mecanismo de interação do HTLV-1 com MSC.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de <i>primers</i> utilizados para confirmação da infecção pelo HTLV pelo método de PCR.....	29
Tabela 2. Sequência de <i>primers</i> utilizados para análise da expressão gênica por PCR em tempo real utilizando o método SYBR ^{TM} Green	38
Tabela 3. Análise de subpopulações celulares antes e após o ensaio de co-cultivo de PBMC com MSC.....	53
Tabela 4. Detecção do HTLV-1 por diferentes metodologias em amostras de MSC obtidas de indivíduos controles e indivíduos HTLV-1 ⁺	73

LISTA DE ABREVIATURAS

°C = grau centígrado

μ = micra

μL = microlitro

3' = região carboxi-terminal do ácido nucléico

5' = região amino-terminal do ácido nucléico

ACD = ácido citrato dextrose

ACTB = beta-actina

APC = do inglês *allophycocyanin*

APCs = células apresentadoras de antígenos

ATL = leucemia das células T do adulto

ATLL = leucemia/Linfoma de Células T do Adulto

ATLV = vírus da leucemia/linfoma de células T do adulto

B19V = Parvovírus B19

BMMC = células mononucleares da medula óssea

BSA = Albumina bovina

cAMP = monofosfato cíclico de adenosina

CCL-8 = do inglês *chemokine ligand 8*

CD = do inglês *cluster differentiation*

CD4⁺ = linfócito T *helper*

cDNA = DNA complementar

CFSE = do inglês *carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester*

CFU-F = unidades formadores de colônias fibroblastóides

COX-1, COX-2 = ciclooxigenase 1 e 2

CPV = carga proviral

CSF = líquido cefalorraquidiano

C_T = do inglês *cycle threshold*

CTL = linfócito T citolítico

CXCL-10 - do inglês *CXC motif chemokine 10*

D.O. = densidade óptica

DC = células dendríticas

DMSO = dimetil sulfóxido

DNA = ácido desoxirribonucleico

dNTP = desoxirribinucleotídeo trifosfato

dsRNA = RNA dupla fita

DTT = ditioneitol

EBV = do inglês *Epstein-Barr* vírus

EDTA = ácido etilenodiaminotetracético

ELISA = do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*

env = gene do envelope viral

FACS = do inglês *fluorescence activated cell sorting*

FITC = do inglês *fluorescein isothiocyanate*

FSC = do inglês *forward light scatter*

gag = gene *antigen group*

GAPDH = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GLUT-1 = transportador de glicose tipo-1

gp = glicoproteína

HAC = portadores assintomáticos do HTLV-1

HAM/TSP = mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical

HBMS - linhagem de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea

HBV = vírus da hepatite B

HCFMRP – USP = Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

HCMV = citomegalovírus humano

HGF = do inglês *hepatocyte growth factor*

HHV = herpes vírus humano

HIV = Vírus da imunodeficiência humana

HLA = antígeno leucocitário humano

HLA-DR = antígeno leucocitário de histocompatibilidade – classe II

HLA-G = antígeno leucocitário humano G

HSPG = proteoglicanas de heparan sulfato

HSV-1= vírus da herpes simples

HTLV-1 = Vírus linfotrópico das células T humanas do tipo 1

HUT-102 = linhagem de célula T humana infectada pelo HTLV-1

ICAM-1 = molécula de adesão intracelular 1

IDO = do inglês *indoleamine 2,3-dioxygenase*

IFN- γ = interferon gamma

IL-6 = interleucina 6

IN = integrase

Kb = kilobase

LGALS1 = gene galectina 1

LTR = do inglês *long terminal repeat*

M = molar

MA = matriz proteica

M-CSF = do inglês *macrophage colony-stimulating factor*

mL = mililitro

mM = milimolar

MO = medula óssea

mRNA = RNA mensageiro

MSC = células multipotentes estromais mesenquimais da medula óssea

MT-2 - linhagem de célula T humana infectada pelo HTLV-1

NK = do inglês *natural killer*

nm = manômetro

NRP-1 = neurofilina-1

OI = osteogênese imperfeita

ORF = do inglês *open reading frame*

PAMP = padrões moleculares específicos associados patógenos

pb = pares de base

PBMC = células mononucleares do sangue periférico

PBS = tampão fosfato tamponado com salina

PCR = reação em cadeia da polimerase

pDC = células dendríticas plasmocitóides

PE = do inglês *phycoerythrin*

PerCP = do inglês *peridinin chlorophyll protein complex*

PGE2 = prostaglandina E2

PHA = fitohemaglutinina

pmol = picomolar

pol = gene da polimerase

PPAR γ = do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor gama*

Pro = proteases

RNA = ácido ribonucleico

RUNX2 = do inglês *runt-related transcription factor 2*

SCF = do inglês *stem cell factor*

SNC = Sistema nervoso central

SSC = do inglês *side scatter*

ssRNA = RNA simples fita

Taq = enzima DNA polimerase de *Thermus aquaticus*

tax = gene de transativação

TAX = proteína de transativação

TGF- β 1 = do inglês *transforming growth factor - β 1*

Th = linfócitos T *helper*

THSC = transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas

TLR3 e TLR4 = receptores do tipo *toll-like* 3 e 4

T_m = temperatura de *melting*.

TNF- α = fator de necrose tumoral alfa

TR = transcriptase reversa

URE = unidades relativas de expressão

VCAM-1 = do inglês *vascular cell adhesion molecule 1*

VEGF = do inglês *vascular endothelial growth factor*

VZV = vírus da varicela zoster

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
RESUMEN	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vii
I. INTRODUÇÃO.....	01
1. Aspectos gerais.....	02
1.1 Células Estromais Mesenquimais Multipotentes (MSC)	02
1.2 Potencial terapêutico das MSC.....	04
1.3 MSC em infecções virais.....	06
2. HTLV-1	11
2.1 Estrutura viral	11
2.2 Epidemiologia e transmissão.....	13
2.3 Aspectos imunológicos.....	13
2.4 Manifestações clínicas do HTLV-1	14
3. Hipótese e justificativa do estudo.....	17
II. OBJETIVOS.....	19
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
1. Casuística.....	23
2. Aspectos Éticos	24
3. Coleta de amostras de sangue periférico e medula óssea (MO)	24
4. Hemograma	24
5. Sorologia para HTLV-1 e HTLV-2.....	24
6. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico e da medula óssea.....	25
7. Separação imunomagnética de linfócitos T CD4 ⁺	25
8. Isolamento e cultura de células MSC	26
9. Quantificação das CFU-F.....	26
10. Linhagens celulares	27
11. Cultura celular	27
12. Detecção do HTLV-1 e HTLV-2 por PCR.....	27
12.1 Extração de DNA	27
12.2 Amplificação do DNA proviral do HTLV-1 e HTLV-2 por PCR	28
12.3 Detecção do HTLV-1 e quantificação absoluta da carga proviral por PCR em tempo real	29

13. Sequenciamento de DNA	30
14. Concentração do HTLV-1 e ensaio de infecção viral	31
15. Análises por citometria de fluxo.....	31
15.1 Contagem de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	31
15.2 Seleção celular (<i>Sorting</i>)	32
15.3 Caracterização imunofenotípica das MSC	32
15.4 Caracterização das subpopulações	33
15.5 Análise da expressão intracelular da proteína viral TAX.....	33
15.6 Ensaio de proliferação de linfócitos T.....	34
16. Ensaio de imunohistoquímica.....	35
17. Microscopia de transmissão	35
18. Detecção de citocinas e proteína viral p19 por ensaio imunoenzimático	36
19. Diferenciação em adipócitos e osteócitos.....	36
20. Extração do RNA total	37
21. Reação de Transcrição Reversa.....	37
22. Quantificação e validação por RT-PCR	38
23. Análise de expressão gênica global pelo método de <i>microarray</i>	39
23.1 Preparação dos <i>Spikes</i>	39
23.2 Reação de marcação	39
23.3 RNA Cleanup	40
23.4 Quantificação do cRNA	40
23.5 Hibridização	41
23.6 Lavagem das lâminas de <i>microarray</i>	41
23.7 Escaneamento das lâminas de <i>microarray</i>	41
23.8 Análise dos resultados	42
24. Análise estatística	42
IV. RESULTADOS	43
1. Imunorregulação em linfócitos T infectados pelo HTLV-1 por MSC	44
1.1 Caracterização morfológica, imunofenotípica e plasticidade celular das MSC isoladas de indivíduos controles.....	44
1.2 Potencial de imunorregulação das MSC sobre linhagens de linfócitos infectados pelo HTLV-1	44
1.3 Potencial de imunorregulação das MSC sobre PBMC isoladas de indivíduos controles e de indivíduos com HTLV-1	48
1.4 Avaliação de subpopulações linfocitárias após o ensaio de co-cultivo de PBMC com MSC.....	53
2. Análise <i>in vitro</i> do efeito da exposição do HTLV-1 em MSC	53
3. Análise da Medula óssea de indivíduos HTLV-1 ⁺	61
3.1 Linfócitos T CD4 ⁺	61
3.2 Análise das MSC	63
4. Detecção de infecção pelo HTLV-1 em MSC de Medula óssea de indivíduos HTLV-1 ⁺	66

5. Diferenças entre MSC isoladas de indivíduos controles e indivíduos HTLV-1 ⁺	74
V. DISCUSSÃO.....	77
VI. CONCLUSÕES.....	90
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
VIII. APÊNDICES	104
1. Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo das MSC isoladas da medula óssea de indivíduos saudáveis	105
2. Características das amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) isoladas de indivíduos saudáveis e de indivíduos HTLV-1 ⁺ que foram utilizadas nos ensaios de linfoproliferação.....	106
3. Efeito da exposição de MSC ao HTLV-1 na expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo	107
4. Características das amostras de PBMC isoladas de indivíduos saudáveis e de indivíduos HTLV-1 ⁺ que foram utilizadas nos ensaios de co-cultivo com MSC .	108
5. Análise por PCR em tempo real da curva de <i>melting</i> gerada após amplificação dos genes GAPDH, ACTB, GLUT-1, HSPG, NRP1 e PPARG pela metodologia de <i>Syber Green</i>	109
6. Caracterização das amostras de medula óssea obtidas de indivíduos saudáveis e indivíduos HTLV-1 ⁺	110
7. Caracterização das amostras de MSC de medula óssea obtidas de indivíduos saudáveis e indivíduos HTLV-1 ⁺	111
IX. ANEXOS.....	112
1. Aceite do Comitê de Ética.....	113
2. Termo de Consentimento aprovado para coleta de sangue periférico.....	114
3. Aceite do Adendo pelo Comitê de Ética	116
4. Termo de Consentimento (Adendo) aprovado para coleta de medula óssea.....	117
5. Artigo científico	119

I. INTRODUÇÃO

1. Aspectos gerais

O microambiente estromal da medula óssea (MO) é composto por matriz extracelular e uma população de células especializadas, incluindo as células-tronco hematopoiéticas (HSC), células estromais mesenquimais multipotentes (MSC), macrófagos, linfócitos, células endoteliais e adipócitos que com auxílio de fatores de crescimento formam uma estrutura fisiológica adequada para manutenção das HSC (SCHOFIEL, 1978).

As MSC são células progenitoras multipotentes caracterizadas pela sua aparência fibroblastóide, capacidade de formar colônias e rápida aderência ao plástico em cultura celular. Essas células foram descritas pela primeira vez por Alexander Friedenstein e cols., que observou em seus experimentos que as células da MO semeadas em baixa densidade, formavam discretas colônias compostas por células alongadas que aderiam ao plástico e assemelhavam-se a fibroblastos. Essas colônias foram nomeadas unidades formadoras de colônia fibroblastóide (CFU-F) e, quando transplantadas subcutâneamente davam origem a um tecido fibroso ou ósseo (FRIEDENSTEIN et al., 1970; OWEN & FRIEDENSTEIN et al., 1988). Mais tarde, em 1991, Arnold Caplan e cols. nomearam essas células como célula-tronco mesenquimal, devido a sua capacidade de se diferenciar em múltiplos tecidos (CAPLAN et al., 1991). No entanto, a adequação desse termo foi contestada por alguns pesquisadores que afirmaram que apenas uma pequena subpopulação dessas células possuía propriedade de célula-tronco (autorrenovação, proliferação indefinida e plasticidade). Por esse motivo, em 2005, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) propôs um novo termo, definido como Células Estromais Mesenquimais Multipotentes (MSC) para se referir à população de células aderentes ao plástico, de morfologia fibroblastóide e com capacidade de diferenciação multipotente (HORWITZ et al., 2005).

1.1 Células Estromais Mesenquimais Multipotentes (MSC)

As MSC compreendem uma população rara de progenitores nestina positiva (0,001 a 0,01%) dentre as células nucleadas presentes na MO e, geralmente, estão localizadas nas regiões centrais, no nicho perivascular em contato próximo com as HSC. Embora a MO seja a principal fonte de MSC, células similares já foram isoladas de outros tecidos biológicos como músculo esquelético, polpa dentária, placenta, cordão umbilical, tecido adiposo (YU et al., 2010), líquido sinovial, líquido amniótico (IN 'T ANKER et al., 2003) entre outros.

Fenotipicamente, a MSC pode expressar vários marcadores de superfície celular, entretanto nenhum é específico. Geralmente, a MSC humana é caracterizada pela expressão de CD90 (Thy-1), CD71, CD73(SH3/4), Stro-1, CD105 (SH2), CD29, CD44, moléculas de adesão CD106 (*vascular cell adhesion molecule* - VCAM-1), CD166 (*activated leukocyte cell adhesion molecule* - ALCAM), CD54 (*intercellular adhesion molecule* - ICAM-1) e ausência de expressão de marcadores hematopoéticos como CD45, CD34, CD14 e CD11. Essas células também não expressam moléculas co-estimulatórias como CD80, CD86 e CD40 e moléculas de adesão CD31 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule* - PECAM-1), CD18 (*leukocyte function-associated antigen-1* - LFA-1) e CD56 (*neuronal cell adhesion molecule-1*). As MSC não expressam o antígeno leucocitário humano (HLA) classe II, mas podem expressar baixos níveis do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) classe I na superfície celular (HAYNESWORTH et al., 1992; GALMICHE et al., 1993; PITTENGER et al., 1999; CONGET et al., 1999; SORDI et al., 2005; LE BLANC et al., 2003).

Em contato com estímulos adequados, as MSC podem se diferenciar em linhagens de origem mesodérmicas, como adipócitos, osteócitos e condrócitos (PITTENGER et al., 1999). Durante o processo de diferenciação em adipócitos, ocorre uma fase de determinação em que as MSC são comissionadas a pré-adipócitos, mas mantêm seu fenótipo de fibroblasto, e na fase final de diferenciação, os pré-adipócitos se tornam adipócitos e adquirem novas funções, como a síntese e armazenamento de lipídios (ROSEN et al., 2006). Esse processo envolve a ativação de uma cascata de sinalização que culmina principalmente na expressão do *peroxisome proliferator activated receptor- γ* (PPAR γ) (JAMES, 2013). No caso da osteogênese, primeiro ocorre o comissionamento a osteoprogenitores seguida da diferenciação em pré-osteoblastos que, com auxílio do fator de transcrição *Runt related transcription factor 2* (RUNX2), transformam-se em osteoblastos maduros (NEVE et al., 2011). Além disso, outros trabalhos também demonstram que as MSC possuem potencial de se diferenciar em células de origem endodérmica e neuroectodérmica (PITTENGER et al., 1999).

Devido ao fato das MSC constituírem uma população heterogênea de células, e não possuírem um único marcador de superfície específico é difícil garantir a autenticidade dessas células. Portanto, são necessários três critérios mínimos para identificar uma MSC: aderência ao plástico, expressão de moléculas de superfície CD105 (endoglin, SH2), CD73 (ecto-5'-nucleotidase) e CD90 (Thy1), e ausência de expressão dos marcadores CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 e HLA-DR. As MSC também devem ser capazes de se diferenciar *in vitro* em adipócitos, condrócitos e osteócitos (DOMINICI et al., 2006). Entretanto, é

importante ressaltar que a maioria das informações sobre o fenótipo ou as características funcionais das MSC são provenientes de experimentos *ex vivo* que foram realizados com células cultivadas. Assim, novos estudos devem ser conduzidos com o objetivo de promover uma melhor caracterização das MSC *in vivo*, observando a célula logo após ser isolada do seu microambiente ou por meio da administração sistêmica das MSC.

1.2 Potencial terapêutico das MSC

Uma das funções biológicas das MSC é contribuir na formação e funcionamento do microambiente estromal, produzindo sinais indutores e regulatórios para o desenvolvimento de outras células estromais e das HSC (DI ROSA et al., 2009). Essa propriedade das MSC tem sido explorada como uma abordagem terapêutica atrativa no transplante de HSC, pois a infusão de MSC pode minimizar a toxicidade do regime de condicionamento, facilitar a enxertia das células hematopoiéticas e diminuir a incidência e a severidade da doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) (LE BLANC et al., 2004).

Outro ponto muito discutido é a habilidade das MSC migrarem para tecidos que sofreram algum tipo de lesão ou sítios inflamatórios e contribuem para o reparo tecidual. Neste caso, ocorre a participação de moléculas de adesão, liberação de quimiocinas e expressão de seus receptores que fazem com que as MSC sejam recrutadas para os tecidos e cruzem a camada de células endoteliais. Essa característica possibilita o uso terapêutico das MSC como suporte para regeneração de tecidos, corrigindo, por exemplo, distúrbios ósseos. Outra forma de explorar a capacidade de migração das MSC é utilizar essas células como veículos para entrega de agentes químicos ou biológicos que agem diretamente na região onde ocorreu o dano tecidual (XIAN et al., 2006).

O fato das MSC se diferenciarem em distintos tipos celulares *in vitro* e se expandirem com facilidade na cultura celular fazem dessas células uma fonte promissora de tecido para ser utilizada na área ortopédica. Efeitos benéficos das MSC foram descritos no tratamento de doenças ósseas, como a osteogênese imperfeita (OI), caracterizada pela fragilidade esquelética e alterações no tecido conjuntivo devido à alteração na produção do colágeno tipo I por osteoblastos (LE BLANC et al., 2005). Em pacientes pediátricos com hipofosfatase (distúrbio genético caracterizado por baixos valores sistêmicos de fosfatase alcalina) que receberam MSC, melhorias clínicas significativas foram observadas, embora o número de estudos clínicos ainda seja limitado (CAHILL et al., 2007).

Outras abordagens terapêuticas têm proposto o uso de MSC no controle da resposta imunológica, principalmente no tratamento de doenças inflamatórias e autoimunes (TYNDALL, 2012; YAMOUT et al., 2010). Muitos trabalhos reportam que as MSC possuem propriedades imunorregulatórias e podem modular a função e ativação dos linfócitos T. Essa atividade de supressão não está relacionada ao reconhecimento de MHC, mais depende do contato célula-célula e da expressão de alguns fatores solúveis (HOFSTETTER et al., 2002; DI NICOLA et al., 2002; BARTHOLOMEW et al., 2002; KRAMPERA et al., 2003; LE BLANC et al., 2003). As MSC promovem inibição na proliferação dos linfócitos T pela manutenção dessas células na fase G0/G1 do ciclo celular. Entretanto, na ausência de MSC, a proliferação de tais células poderá ser retomada com a estimulação de ativadores humorais ou celulares, indicando que fatores relacionados à apoptose não estão envolvidos nesse processo (GLENNIE et al., 2005).

Experimentos *in vitro* mostram que a MSC pode controlar a resposta imunológica inata e adaptativa, impedindo a maturação e função das células dendríticas e inibindo a proliferação e diferenciação dos linfócitos B. As MSC também atuam sobre as células *natural killer* (NK), inibindo a resposta alogênica, a resposta citotóxica das células T CD8⁺ e a proliferação de linfócitos estimulados com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28. Os mecanismos pelos quais as MSC modulam a função das células imunes ainda não estão completamente esclarecidos. Sabe-se que a proporção entre MSC e linfócitos é um fator limitante (TSE et al., 2003) e que a interação entre células imunes e MSC estimula a secreção de fatores solúveis pela MSC que inibem os linfócitos T alorreativos. Entre esses fatores solúveis estão: o *stem cell factor* (SCF), interleucina-6 (IL-6), IL-8, IL-10, IL-12, interferon-gama (IFN)- γ , prostaglandina E2 (PGE2), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), galectina-1, *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), *hepatocyte growth factor* (HGF) e *transforming growth factor - β 1* (TGF- β 1).

A IDO é uma enzima que atua na degradação do triptofano, um aminoácido essencial para proliferação dos linfócitos. Em MSC, a IDO não é constitutivamente expressa, mas após o estímulo de citocinas inflamatórias, principalmente por IFN- γ , a transcrição de IDO é aumentada significativamente. Uma vez que IDO é expressa em MSC, essa enzima catalisa a degradação do triptofano e induz o efeito imunossupressor em linfócitos T (LE BLANC & MOUGIAKAKOS, 2012, DORRONSORO et al., 2014). Os efeitos imunossupressores da PGE2, enzima sintetizada por ciclooxigenases 1 e 2 (COX-1, COX-2), estão relacionados com a redução na secreção de IL-2, IFN- γ e indução nos níveis de monofosfato cíclico de

adenosina (cAMP), levando à inibição da proliferação dos linfócitos T (SAKATA et al., 2010). A PGE2 e outros fatores como TGF- β 1, HGF, IL-6 e HLA-G5 são constitutivamente produzidos pelas MSC e podem ter sua produção aumentada devido à liberação de citocinas durante a interação das MSCs com as células imunes.

O papel do TGF- β 1 e HGF na imunossupressão não está bem esclarecido, mas alguns autores descrevem um efeito potencializado desses dois fatores quando são utilizados concomitantemente. O papel de HLA-G5 na imunorregulação ocorre por um mecanismo incluindo linfócitos T reguladores CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ e IL-10 e foi descrito em vários tipos de condições patológicas, tais como infecções virais, tumores, doenças autoimunes e transplante de órgão sólido (SELMANI et al., 2009).

No entanto, apesar do evidente efeito imunossupressor das MSC, essas células não são constitutivamente inibidoras. As MSC são altamente dependentes das condições ambientais e sob condições inflamatórias agudas, polarizadas por macrófagos M1 e linfócitos T *helper* (Th), a presença de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ reforça a capacidade imunossupressiva das MSC por meio da produção aumentada de ICAM-1, CXCL-10, CCL-8 e IDO. Por outro lado, sob condições inflamatórias crônicas, quando as MSC são polarizadas por macrófagos M2 e citocinas Th2, as mesmas podem ser recrutadas para o processo fibrótico (PROCKOP, 2013). Assim, os efeitos terapêuticos das MSC dependem do ambiente inflamatório e esse fato deve ser considerado na terapia celular (KRAMPERA et al., 2006).

Por esse motivo, existe um interesse crescente em compreender melhor as propriedades imunes das MSC. É conhecido que as MSC podem exercer propriedades anti-inflamatória ou imunossupressora sobre as principais células do sistema imune, entretanto, é possível que as MSC possam alterar sua função imunossupressora de acordo com a situação patológica ou o estado clínico do paciente. Dessa forma, saber o seu exato mecanismo de ação e como controlar sua eficiência se tornaram um desafio para a medicina. Ampliar os conhecimentos sobre o comportamento das MSC em diferentes ambientes pode trazer avanços importantes na gestão de transtornos que atualmente carecem de um tratamento padrão.

1.3 MSC em infecções virais

Embora as MSC possuam importantes propriedades em condições fisiológicas, pouco é conhecido sobre sua eficácia em condições patológicas, como durante um processo de infecção viral. Portanto, atualmente existem três frentes de estudos que investigam o comportamento biológico e as propriedades terapêuticas das MSC em infecções virais.

A primeira linha de pesquisa procura explorar as qualidades da MSC como uma ferramenta para produção de vacinas. O uso dessas células como vetores para terapia gênica vem sendo realizado no combate ao câncer ou no tratamento de doenças autoimunes, devido à sua propriedade inata de migrar para os tecidos tumorais ou inflamatórios (KLOPP et al., 2007; LE BLANC & RINGDEN, 2007). Desta mesma forma, a MSC modificada pode ser utilizada como vacina celular para induzir uma resposta imunológica contra infecções virais e após serem infundidas mimetizam a infecção natural. Entretanto, apesar das expectativas promissoras, melhorias ainda são necessárias para indução de uma memória imunológica duradoura, uma vez que as MSC transplantadas podem persistir por poucos dias *in vivo*. Além disso, pouco é conhecido em relação à resposta antígeno específico e sobre a imunidade humoral e celular após a imunização com as MSC modificadas.

A segunda linha de pesquisa estuda as propriedades imunorregulatórias da MSC em ambientes inflamatórios atuando como uma célula pró-inflamatória ou anti-inflamatória. Karlsson e cols. (2008) demonstraram que as MSC têm efeito imunomodulador alterado durante o processo da infecção viral por citomegalovírus humano (HCMV) e *Epstein-Barr* vírus (EBV), não inibindo a proliferação de linfócitos citolíticos (CTL) específicos para o vírus e permitindo a produção de IFN- γ induzida pelo vírus (KARLSSON et al., 2008). Ainda foi descrito que a infecção por HCMV em MSC afeta a capacidade imunossupressora dessas células, pois as células infectadas apresentam uma atividade da enzima IDO reduzida (MEISEL et al., 2014). É possível que a perda das propriedades imunossupressoras das MSC esteja relacionada com o reconhecimento de estruturas genéticas do vírus pelos receptores do tipo *toll-like* 3 e 4 (TLR3 e TLR4) que são expressos em MSC. Assim, após a ligação dos TLR3 e TLR4 com o antígeno a atividade das MSC em suprimir a proliferação dos linfócitos T CD4⁺ seria prejudicada (LIOTTA et al., 2008). Em contraste, outro grupo de pesquisa demonstrou que a ligação dos TLR3 e TLR4 aumentam as propriedades imunossupressoras das MSC via IFN- β e IDO (OPITZ et al., 2009).

A terceira linha de pesquisa investiga a função das MSC como um reservatório viral, responsável pela manutenção da infecção latente. Desta forma, tendo em vista que as MSC são preferencialmente encontradas na MO e que esse tecido é fundamental para a manutenção da homeostase celular, um grande interesse surgiu em investigar o impacto das infecções virais neste microambiente. Inicialmente, análises realizadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) em HSC obtidas de pacientes HIV-1⁺ mostraram que essas células não são infectadas. Porém, alguns casos raros exibiram positividade para o HIV em amostras de HSC,

mas neste caso, a presença do material genético viral pode ser atribuída à contaminação das HSC com linfócitos ou monócitos provenientes da MO (DAVIS et al., 1991; NEAL et al., 1995). Outro estudo, realizado com pacientes infectados pelo vírus linfotrópico das células T humanas (HTLV-1), mostrou a existência de uma infecção latente na MO desses indivíduos, no entanto, o fenótipo das células infectadas com o HTLV-1 ainda é incerto (JACOBSON et al., 1997). A detecção de DNA proviral do HTLV também foi observada em células mononucleares da MO de pacientes com leucemia das células T do adulto (ATL), mas as colônias individuais formadas pelas células progenitoras hematopoiéticas não apresentaram infecção (NAGAFUJI et al., 1993).

Alguns estudos sugerem que as evidências de infecção na MO resultaram da capacidade dos vírus em infectar células auxiliares da MO, como MSC, alterar suas funções e provocar graves consequências biológicas (SMIRNOV et al., 2007; CHOUDHARY et al., 2011). A relação entre vírus e MSC é uma abordagem recente e ainda está sob investigação. Estudos *in vitro* com retrovírus mostraram que MSC expostas ao HIV geram colônias estromais com a presença de ácidos nucleicos específicos para o vírus e possuem a capacidade de formar colônias fibroblastóide suprimidas (WANG et al., 2002). A exposição de MSC derivadas da MO a proteínas virais do HIV como p55 Gag e gp120 Rev também resultou em alterações significantes no potencial de diferenciação adipogênico e osteogênico dessas células (COTTER et al., 2007, 2008). Outros resultados sugerem que MSC cultivadas na presença de 5% de soro de pacientes HIV⁺ podem ser infectadas, resultando em um maior potencial de diferenciação adipogênico dessas células (COTTER et al., 2011). A exposição *in vitro* de MSC derivadas da parede vascular à proteína viral TAT do HIV também foi relacionada a alterações na proliferação e plasticidade celular (GIBELLINI et al., 2011). Ademais, experimentos *ex vivo* demonstram que MSC isoladas de camundongos transgênicos, que expressam algumas proteínas do HIV, possuem alterações em suas propriedades biológicas, como proliferação, diferenciação e função parácrina (CHENG et al., 2013) (Figura 1).

De acordo com a literatura, as MSC também podem ser alvo para infecções causadas pelos vírus da família *Herpesviridae* (PARSON et al., 2004; SMIRNOV et al., 2007; CHOUDHARY et al., 2011). Em 2004, Parsons e cols. relataram pela primeira vez a susceptibilidade de MSC à infecção por herpesvírus Kaposi (HHV-8) (PARSON et al., 2004). Outro estudo realizado por Sundin e cols. (2006) sugere que MSC podem ser infectadas *in vitro* com HCMV e vírus da herpes simples (HSV-1), mas não com EBV. No entanto, uma

pequena subpopulação de MSC expressa CD21, o receptor para a absorção de EBV, assim, a hipótese de infecção por EBV em MSC não pode ser excluída. Além disso, os autores relatam que é pouco provável que as MSC isoladas de doadores soropositivos saudáveis sejam infectadas por CMV, HSV-1, HSV-2, ou EBV, uma vez que não foi detectado DNA viral em MSC isoladas de indivíduos infectados com esses vírus (SUNDIN et al., 2006). Ainda, Smirnov e cols. (2007) demonstraram que a infecção por HCMV em MSC *in vitro* altera significativamente as funções destas células e leva à modificação das moléculas de superfície das MSC. Além disso, durante o processo de diferenciação as MSC que foram induzidas à diferenciação osteogênica e adipogênica foram susceptíveis à infecção por HCMV em todas as fases de diferenciação, e a capacidade de diferenciação foi diminuída devido à infecção por HCMV (SMIRNOV et al., 2007). Em 2011, Choudhary e cols. (2011) relataram que o HSV-1 pode induzir efeitos citopáticos e replicar produtivamente em MSC humana *in vitro*. Além disso, os autores indicam a expressão de heparan sulfato na superfície celular como o principal determinante para a entrada e proliferação de HSV-1 em MSC (CHOUDHARY et al., 2011) (Figura 1).

A infecção persistente por parvovírus B19 (B19V) em MSC foi documentada com uma baixa prevalência (5% ou uma em cada 20 doações de MSC) e a carga viral detectada também foi muito baixa (1×10^3 geq/ 10^5 células). Embora as células infectadas não apresentarem alterações no seu crescimento e diferenciação, a presença de agentes virais, especialmente os causadores de infecções latentes, podem comprometer o benefício clínico destas células (SUNDIN et al., 2008). Neste sentido, um estudo realizado por Rollin e cols. (2007) mostraram um risco muito baixo de transmissão viral e reativação de vírus latentes em casos de transplante de MSC, incluindo B19V com baixa carga viral (61,2 cópias / μ g DNA) (ROLLIN et al., 2007).

Também existem relatos na literatura de que MSC podem ser infectadas *in vitro* pelo vírus da hepatite B (HBV). Ma e cols. (2011) demonstraram que o HBV pode infectar e replicar em MSC (MA et al., 2011). Outro estudo mostrou que as MSC podem ser eficientemente infectadas pela absorção do HBV *in vitro*. Além disso, esses autores mostraram que o transplante de MSC infectadas pelo HBV em camundongos leva à trans-infecção nos tecidos extra-hepáticos através do recrutamento de MSC para o tecido lesionado (modelo de infarto do miocárdio) (RONG et al., 2008).

Embora existam vários estudos sobre a infecção de MSC, até o momento não existe nenhum relato considerando essa abordagem durante a infecção pelo HTLV-1. Portanto, mais

estudos são necessários para avaliar o efeito de infecções virais em MSC e as consequências clínicas dessa infecção.

Figura 1. Infecções virais no microambiente da medula óssea. As infecções por HIV, HCMV e HTLV-1 foram descritas como presentes no microambiente da MO. As MSC isoladas deste microambiente podem sofrer alterações ou serem infectadas por diferentes vírus: Parvovirus B19 (B19V) infecta MSC, mas não altera seu crescimento e diferenciação celular. As MSC infectadas são incapazes de transmitir a infecção por B19V e análises *ex vivo* mostram baixa prevalência (0,1%) (ROLLIN et al., 2007) e baixa carga viral (1×10^3 geq/ 10^5 células) (SUNDIN et al., 2008); A infecção por citomegalovírus humano (HCMV) altera a morfologia, modifica a expressão de moléculas de superfície e o potencial de diferenciação das MSC (WEI et al., 2011; SMIRNOV et al., 2007); Os vírus (HSV-1 e KSHV) infectam as MSC *in vitro*, induzem um efeito citopático e a infecção pode ser transmitida para MSC *naive* (CHOUDHARY et al., 2011; PARSON et al., 2004); O HIV altera o fenótipo, a proliferação, o potencial de diferenciação e a função parácrina das MSC (WANG et al., 2002; COTTER et al., 2007, 2008) e por fim o HBV pode infectar (*in vitro*) e replicar em MSC sem alterar sua morfologia e características fenotípicas (MA et al., 2011). Após a infecção as MSC podem transmitir o vírus para outros tecidos como coração, pulmão, fígado e rins (RONG et al., 2008).

2. HTLV-1

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) foi o primeiro retrovírus humano associado a uma doença a ser descrito. Os primeiros relatos da literatura surgiram em 1977 com a descrição de um vírus oncogênico nomeado de Vírus da Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLV) (TAKATSUKI et al., 1979). Em 1980, a partir de linfócitos T derivados dos linfonodos e do sangue periférico de um paciente com uma doença linfoproliferativa, foi isolado outro vírus nomeado como Vírus da Leucemia/Linfoma de Células T Humanas (HTLV) (POIESZ et al., 1980). Posteriormente, foi reconhecido que ambos isolados se referiam ao mesmo vírus e que havia associação causal entre Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL) e HTLV. Em 1983, um grupo francês, que realizava estudos na Martinica (ilha francesa no Caribe) e na Guiana Francesa sobre a epidemiologia e o impacto clínico do HTLV nessa área, associou a infecção por esse retrovírus a uma neuromielopatia crônica originalmente denominada Paraparesia Espástica Tropical (TSP) (GESSAIN, 1985). Uma moléstia similar foi descrita na mesma época no Japão e classificada como mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM) (OSAME et al., 1986b).

Desde o isolamento do HTLV-1, mais três tipos virais já foram descritos, HTLV-2 (KALYANARAMAN et al., 1982), HTLV-3 (CALATTINI et al., 2005; WOLFE et al., 2005) e HTLV-4 (WOLFE et al., 2005). O HTLV-2 raramente é associado a desordens clínicas, porém, alguns indivíduos infectados podem desenvolver uma linfocitose benigna e alguns sintomas neurológicos (HJELLE et al., 1992). Em relação ao HTLV-3 e HTLV-4, ainda existem poucas informações para determinar se esses vírus podem ser transmitidos entre humanos e se são capazes de desencadear doenças em seus portadores (GESSAIN et al., 2013).

2.1 Estrutura viral

O HTLV-1 é um retrovírus complexo que pertence ao gênero *Deltaretrovirus* e a subfamília *Orthoretrovirinae*. O seu genoma é formado por duas fitas simples de RNA que codificam proteínas estruturais e enzimas similares a de outros retrovírus, como *gag*, *pro*, *pol* e *env*. O gene *gag* é responsável pela síntese de proteínas da matriz (p19), do capsídeo (p24) e do nucleopacsideo (p15). O gene *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa (TR) e integrase (IN), o gene *pro* codifica as proteases (Pro), e o gene *env* as proteínas de superfície (gp46) e de transmembrana (gp21) do envelope viral (LAIRMORE et al., 2011; MATSUOKA & JEANG, 2007). Durante o ciclo de vida do vírus, o RNA é convertido em

DNA dupla fita e inserido no genoma do hospedeiro. A forma do retrovírus inserida no genoma denominada como DNA proviral possui 9.032 pares de base e suas extremidades são flanqueadas por duas regiões repetidas, chamadas LTR (*long terminal repeats*). As sequências LTR são importantes para a integração do DNA proviral no genoma do hospedeiro e para a regulação transcricional do genoma viral (KASHANCHI, 2005). A extremidade 3' do genoma viral expressa um RNA mensageiro (mRNA) com *splicing* alternativo que codificam proteínas com diferentes fases de leitura abertas (ORF) I-IV. As ORFs I e II da região gênica *pX* codificam as proteínas auxiliares p12 (p8), p30, p13 e as ORFs III e IV codificam as proteínas regulatórias REX e TAX que são essenciais na replicação viral. O genoma do HTLV-1 também codifica um mRNA anti-sense a partir da região 3' LTR. O transcrito desta região é denominado fator bZIP do HTLV-1 ou HBZ e desempenha um papel importante na infectividade e replicação viral (GAUDRAY et al., 2002) (Figura 2).

A proteína TAX (*Transcriptional Activator of pX region*) tem um papel crítico na transformação celular, atuando no ciclo de vida do vírus, na expressão de genes virais e celulares, incluindo genes envolvidos na ativação e proliferação de células T (BEX & GAYNOR et al., 1998).

Figura 2. Estrutura do HTLV-1. O genoma do HTLV-1 com aproximadamente 9kb é flanqueado por regiões LTR e contém os genes estruturais *gag*, *pro*, *pol* e *env*, além da região *pX* que codifica distintas proteínas através de diferentes fases de leitura abertas (ORF) I-IV. As proteínas auxiliares p21, p12, p13 e p30 e as proteínas regulatórias REX e TAX são codificadas pela região *pX*. A região 3' LTR sintetiza um mRNA anti-sense denominado HBZ. A região gênica *gag* codifica as proteínas estruturais da matriz proteica (p19), do capsídeo (p24) e do nucleocapsídeo (p15); o gene *pol* é expresso como uma poliproteína precursora GAG-PRO-POL que codifica a enzima transcriptase reversa (TR), integrase (IN) e RNase H; o gene *env* codifica a proteína de superfície (gp46) e transmembrana (gp21) do envelope viral. Imagem modificada de LAIRMORE *et al.*, 2011 e MATSUOKA & JEANG, 2007.

2.2 Epidemiologia e transmissão

A infecção pelo HTLV-1 acomete cerca de 20 milhões de indivíduos em todo o mundo e as áreas endêmicas são principalmente o Japão, Caribe e a África. Estudos epidemiológicos demonstram que o Brasil é considerado o país com o maior número absoluto de indivíduos infectados pelo HTLV-1, com cerca de 2,5 milhões de pessoas infectadas (CATALAN-SOARES et al., 2005). Na região de Ribeirão Preto, relatamos que 0,1% dos doadores de primeira vez possuem sorologia positiva para HTLV-1/2 (PINTO et al., 2012).

O HTLV-1 é transmitido pelo contato com fluidos corporais contendo células infectadas. Os meios mais comuns são pela exposição a hemocomponentes contaminados, pelo contato sexual e por transmissão vertical, que muitas vezes é detectado após um período prolongado de amamentação (6-9 meses). A infecção ocorre preferencialmente pelo contato célula-célula, através da transferência do vírus a partir de uma célula infectada para uma célula alvo pela formação de uma sinapse viral e/ou pela formação de estruturas denominadas de biofilme. Os mecanismos que facilitam a transmissão do HTLV-1 pelo contato célula-célula ainda não são bem conhecidos, porém até o momento foram descritas três moléculas relacionadas com a interação e/ou entrada do HTLV-1 nas células: o transportador de glicose tipo-1 (GLUT-1) (MANEL et al., 2003), as proteoglicanas de heparan sulfato (HSPG) e a neurofilina-1 (NRP-1) (GHEZ et al., 2006). Estudos mostram que GLUT-1 está envolvido na fusão do envelope viral, mediada pelo contato célula-célula, o HSPG se liga às partículas de vírus na superfície da célula e com auxílio NRP-1 facilita a entrada do HTLV-1 na célula alvo (GHEZ et al., 2010).

2.3 Aspectos imunológicos

Os alvos celulares *in vivo* da infecção por HTLV-1 são preferencialmente os linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico (RICHARDSON et al., 1990), mas o HTLV-1 também pode ser encontrado nos linfócitos T CD8⁺ (CHO et al., 1995). Uma infecção moderada em linfócitos B foi documentada (FRANCHINI et al., 1985), mas nesse caso, as células B foram mantidas em cultura e a possibilidade de infecção *in vitro* por linfócitos T deve ser considerada (FRANCHINI et al., 1985) (Figura 3). Após a infecção, o HTLV-1 persiste nessas células e apesar de que muitas vezes menos de 5% das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) serem infectadas, a carga proviral (CPV) é elevada e a resposta imune celular se torna cronicamente ativada.

As células inatas do sistema imunológico como monócitos, macrófagos e células dendríticas (DC) também são permissíveis para o vírus *in vitro* ou são infectadas *in vivo* (KOYANAGI et al., 1993, REVEL et al., 1993, MACATONIA et al., 1992) (Figura 3). Um estudo com DC isoladas a partir de um indivíduo infectado com HTLV-1, mostrou que a CPV por 10^4 células foi maior em pDC (DC plasmocitoides) purificadas do que em células totais mononucleares do sangue periférico (PBMC) (HISHIZAWA et al., 2004). Outro estudo realizado com 22 indivíduos infectados com HTLV-1 demonstrou que a CPV em monócitos varia entre 0 e 140 cópias/ 10^4 células e sugere uma infecção latente de monócitos, permitindo o escape do reconhecimento imunológico (KOYANAGI et al., 1993). Finalmente, a infecção pelo HTLV-1 em células *natural killer* (NK) ativadas foi documentada somente *in vitro* (LO et al., 1992), porém, um trabalho *in vivo* demonstrou a infecção de células invariantes NK em pacientes com HTLV-1 (AZAKAMI et al., 2009).

Figura 3. Representação dos principais fatos históricos relacionados à descoberta dos tipos virais do HTLV, descrição das manifestações clínicas e alvos celulares dessa infecção. Na década de 80 foram descritos o HTLV-1 e o HTLV-2, assim como as principais manifestações clínicas relacionadas com a infecção pelo HTLV-1. Na década de 90, foram descritos os principais alvos celulares para o HTLV-1. No ano de 2005, foram descritos o HTLV-3 e o HTLV-4 e no presente trabalho de 2014, investigamos a infecção por HTLV-1 em células MSC da MO.

2.4 Manifestações clínicas do HTLV-1

Entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1, 2-3% são acometidos por uma malignidade agressiva de células T maduras denominada ATLL, e 0,25 a 4% desenvolvem uma condição inflamatória não neoplásica, denominada HAM/TSP. Outras manifestações como uveíte, síndrome de Sjögren, broncoalveolite, artrite, polimiosite, são mais raras,

porém, também podem ser observadas nos indivíduos infectados (LAGRENADE et al., 1990; WATANABE et al., 1997; NISHIOKA et al., 1989). Entretanto, a maior parte das pessoas infectadas pelo HTLV-1 (95%), não desenvolve as manifestações clínicas e permanecem como portadores assintomáticos (OSAME et al., 1997). Ainda não são conhecidos os mecanismos pelos quais o HTLV-1 causa as diferentes manifestações clínicas e também não se sabe a razão da doença ocorrer normalmente após décadas do início da infecção e afetar menos de 10% dos portadores.

A ATLL é uma doença maligna agressiva, com rápido crescimento neoplásico dos linfócitos T infectados pelo HTLV-1 e apresenta um prognóstico muito ruim. O potencial oncogênico do HTLV-1 advém da atividade de suas proteínas regulatórias, principalmente de TAX. A expressão de TAX pode desregular a expressão de genes envolvidos no controle do crescimento celular, levando a um processo de transformação maligna e expansão clonal da célula maligna que desencadeia no desenvolvimento de ATLL (YOSHIDA, 2001). De acordo com as características clínicas, a ATLL pode ser classificada como: indolente, crônica, aguda e linfomatosa e essa classificação geralmente está relacionada com a sobrevida média dos pacientes (BAZARBACHI & HERMINE, 2001). Recentemente, foi descrito que a expansão clonal do HTLV-1 é favorecida dependendo do local de integração proviral no genoma da célula hospedeira e que as células filhas de cada clone compartilham o mesmo sítio de integração genômica. A integração do provírus, no mesmo sentido transcricional do genoma ou em regiões com transcrição ativa, proporciona maior expansão dos clones e quanto maior for o número absoluto de clones maior a chance de transformação maligna e consequentemente o risco de desenvolver ATLL (COOK et al., 2014).

A HAM/TSP é uma doença inflamatória crônica e progressiva do sistema nervoso central (SNC). Caracterizada clinicamente por espasticidade, fraqueza e comprometimento dos músculos dos membros inferiores, dor lombar baixa, distúrbios urinários e sintomas sensitivos como formigamento, agulhadas e queimação (UCHIYAMA et al., 1997). De acordo com a literatura, o aparecimento dos sintomas clínicos de HAM/TSP pode levar meses ou décadas. A idade média de início é geralmente de 43,8 anos e a frequência é sempre maior em mulheres do que em homens (1:2,3) (homem/mulher) (NAKAGAWA et al., 1995). Relatos indicam que a resposta inflamatória observada em HAM/TSP pode ser caracterizada pela presença de linfócitos T e anticorpos específicos para o HTLV-1 no SNC. De acordo com exames clínicos, é observada uma perda de mielina, degeneração dos axônios e infiltração linfocítica, com a presença de macrófagos, astrócitos e linfócitos atípicos

("Células de flores") no sangue periférico e no líquido cefalorraquidiano (CSF) de indivíduos com HAM/TSP (AYE et al., 2000). Em resposta à presença de infecção, os linfócitos T infiltrados no SNC provocam a libertação de citocinas, especificamente citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ) ativando uma resposta inflamatória. O acúmulo de citocinas pró-inflamatórias leva à desmielinização e meningiomielite linfocítica (UMEHARA et al., 1994). A progressão clínica de HAM/TSP está relacionada com um aumento na carga proviral ou ainda com fatores genéticos do hospedeiro, como a baixa eficiência da resposta imunológica (KANNAGI et al., 2004).

A resposta imunológica do hospedeiro contra o vírus HTLV-1 é realizada pelos linfócitos CTL e células NK. As CTL específicas para o HTLV-1 atuam no controle da replicação viral por três principais mecanismos: i) produção de INF- γ ; ii) lise das células infectadas com o vírus via os receptores de morte Fas-FasL; iii) através das moléculas efetoras perforina e granzima (BANGHAM, 2009). À medida que o curso da infecção é estabelecido o organismo conduz a um equilíbrio dinâmico entre a persistência da replicação viral e a resposta imunológica do hospedeiro. Alterações neste ponto de equilíbrio são determinadas por um aumento na carga proviral que resultam em maior incidência das doenças associadas. Outro fator relevante é a eficiência ou qualidade da resposta das CTL do hospedeiro contra o vírus. Embora a eficiência das CTL seja essencial para a destruição das células infectadas, a resposta imunológica provoca liberação de fatores pro-inflamatórios que podem contribuir para o desenvolvimento de HAM/TSP. Dessa forma, a eficiência das CTL é crítica para a determinação da eficácia da resposta imunológica (MOSLEY et al., 2005; BANGHAM, 2008). Sabe-se que a alta carga proviral do HTLV-1 e a frequência de células contendo o provírus na circulação estão relacionadas a um maior risco no desenvolvimento das doenças associadas, porém os fatores que determinam o controle da carga proviral em cada indivíduo ainda não estão bem definidos. Dessa forma, muito se discute sobre o papel das células T CD8⁺ específicas para o HTLV, na tentativa de elucidar se as mesmas contribuem para o processo infamatório de HAM/TSP ou se podem proteger contra a doença, uma vez que essa população celular é responsável por controlar a quantidade de linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1 (BANGHAM, 2000).

Até o momento, não existe uma estratégia terapêutica eficaz para nenhuma das principais doenças relacionadas ao HTLV-1. No caso dos indivíduos com HAM/TSP, é indicado um tratamento paliativo, com uso de corticoides, antivirais e interferons na tentativa de melhorar os sintomas clínicos. Para os pacientes com ATLL, uma alternativa é o

transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas (THSC). De acordo com a literatura, alguns pacientes com ATLL que foram submetidos ao THSC apresentaram bons resultados, com ausência do provírus, sugerindo que o transplante alogênico é um tratamento eficaz. Entretanto, em outros indivíduos, a remissão completa da doença não ocorreu e o provírus tornou-se detectável novamente (HISHIZAWA et al., 2010; SHIRATORI et al., 2008). As razões pelas quais a infecção pelo HTLV-1 permanece em alguns pacientes com ATLL, após o transplante alogênico, ainda não são compreendidas. É possível, que os fatores relacionados com o reservatório do HTLV podem estar envolvidos, favorecendo o reaparecimento de uma replicação viral do HTLV-1 e impossibilitando a cura dos indivíduos com ATLL. Essa hipótese tem sido reforçada por Levin e cols. (1997) que investigaram a possibilidade da MO ser considerada um reservatório para o HTLV-1. Nesse trabalho, Levin e cols. (1997) observaram uma extensa infecção pelo HTLV-1 na MO de três indivíduos com doença neurológica associada ao HTLV-1. No entanto, o fenótipo das células infectadas com HTLV-1 não foi determinado, assim como se a MO de portadores assintomáticos também possuem uma viremia persistente (LEVIN et al., 1997).

3. Hipótese e justificativa do estudo

As pesquisas com o HTLV-1 são de extrema importância por duas principais razões: em primeiro lugar, o HTLV-1 é o agente etiológico de uma série de patologias para as quais não há nenhuma cura e não há tratamento eficaz, consequentemente, o HTLV-1 é responsável por uma parcela significativa de morbidade e mortalidade da população. Em segundo lugar, a infecção por HTLV-1 é um excelente modelo da dinâmica que envolve o controle imunológico a patógenos. A infecção se inicia por um longo período de latência clínica, até que o sistema imunológico do hospedeiro permite que o vírus se espalhe por todo o organismo desencadeando o aparecimento dos processos patológicos das manifestações clínicas. Entretanto, a habilidade com que HTLV-1 escapa do sistema imunológico e permite a continuidade da infecção por toda a vida do indivíduo ainda não está esclarecida. Acredita-se que ao longo da patogênese da infecção ocorra uma migração e permanência de células T infectadas pelo HTLV-1 na medula óssea (GRANT et al., 2002). Esse evento pode acarretar uma infecção de células residentes da medula óssea, como as MSC e como consequência gerar um reservatório de células HTLV⁺. Essas células infectadas podem permanecer por um longo período na medula óssea em estado latente, favorecendo assim o escape imunológico. Desse modo, as MSC seriam uma fonte de infecção capaz de transmitir o vírus para os linfócitos ainda na medula óssea e poderiam ser responsáveis pela manutenção da infecção na

corrente sanguínea. Entretanto, ainda não é conhecido se MSC são susceptíveis à infecção por HTLV-1 ou se MSC isoladas da medula óssea de indivíduos infectados pelo HTLV-1 são infectadas por esse vírus.

Outro ponto relevante são as alterações provocadas pela infecção viral em MSC. Estudos recentes mostram que MSC infectadas por vírus podem perder suas habilidades fisiológicas e apresentar comportamentos distintos dependendo do agente infeccioso (SMIRNOV et al., 2007; CHOUDHARY et al., 2011). No caso da infecção por HTLV, as células MSC isoladas desses indivíduos podem estar com sua integridade biológica, habilidade clonogênica e propriedades imunoregulatórias alteradas e não promoverem um controle da resposta imunológica adequado. Dessa forma, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das principais manifestações clínicas do HTLV-1 podem estar intimamente relacionados a alterações na função das MSC.

Por outro lado, pouco se sabe sobre a influência das MSCs no controle de infecções virais. De acordo com a literatura, a funcionalidade e a capacidade das MSC em inibir as células do sistema imune pode ser modulada por mediadores inflamatórios libertados pelas células imunes ativadas, tais como IFN- γ , IL-1 β e TNF- α . Dessa forma, as MSC podem fornecer um equilíbrio da resposta imune, e adquirir uma capacidade pró-inflamatória ou anti-inflamatória de acordo com o estímulo e as condições fisiológicas do organismo (WATERMAN et al., 2010; AULETTA et al., 2012). No caso da infecção por HTLV-1, o desenvolvimento de HAM/TSP está relacionado a um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias em resposta à presença do vírus (UMEHARA et al., 1994). Outro estudo reportou que o silenciamento de genes virais do HTLV-1 pode estar envolvido com a liberação de fatores solúveis tais como, citocinas e quimiocinas secretadas pelas células estromais (NAGAI et al., 2008). Porém, o exato mecanismo biológico que permite a interação entre células estromais da medula óssea com células T infectadas, resultando na supressão da expressão gênica do HTLV-1, ainda não está bem elucidado.

Dessa forma, analisar o efeito imunomodulatório das MSC em linfócitos T infectados pelo HTLV-1 e esclarecer o mecanismo de ação do HTLV-1 em MSC poderá ajudar a determinar os fatores que estão envolvidos na modulação da infecção pelo HTLV-1, assim como as vias de sinalização gênica responsáveis pela patogênese da infecção por HTLV-1.

II. OBJETIVOS

Geral

Investigar a imunomodulação “*in vitro*” de células estromais mesenquimais multipotentes humanas (MSC) sobre linfócitos T infectados pelo HTLV-1, o efeito deste retrovírus nas propriedades das MSC e a susceptibilidade da MSC à infecção pelo HTLV-1.

Específicos

- ✓ Determinar a capacidade das MSC em modular a expressão do gene *tax* e do antígeno p19 do HTLV-1 em linhagens celulares de linfócitos T infectados pelo HTLV-1;
- ✓ Estudar do potencial de inibição da proliferação das MSC sobre linfócitos isolados de indivíduos portadores do HTLV-1;
- ✓ Analisar a expressão de genes virais do HTLV-1, genes envolvidos na imunorregulação e a frequência de subpopulações linfocitárias após o co-cultivo de MSC com linfócitos isolados de indivíduos portadores do HTLV-1;
- ✓ Investigar o efeito *in vitro* da exposição do HTLV-1 em MSC;
- ✓ Avaliar a susceptibilidade das MSC a infecção pelo HTLV-1 *in vitro*;
- ✓ Analisar os aspectos morfológicos das células obtidas da medula óssea (MO) na presença da infecção pelo HTLV-1;
- ✓ Isolar linfócitos T CD4⁺ e MSC da MO de indivíduos infectados pelo HTLV-1;
- ✓ Identificar a infecção viral pelo HTLV-1 nas duas populações celulares isoladas da MO;
- ✓ Avaliar as modificações morfológicas, imunofenotípicas e funcionais das MSC entre indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controle;
- ✓ Avaliar a expressão gênica global nas amostras de MSC obtidas de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

III. MATERIAL E MÉTODOS

A estratégia experimental deste trabalho foi realizada de acordo com a Figura 4.

Figura 4. Fluxograma das etapas experimentais deste trabalho. A) Potencial de imunorregulação das MSC em linfócitos T infectados pelo HTLV-1. Após o co-cultivo de linfócitos HTLV-1⁺ com células estromais mesenquimais multipotentes (MSC), foram avaliadas a expressão de p19 e IL-6 por ELISA, a expressão gênica por PCR em tempo real, a proliferação celular e a frequência de subpopulações linfocitárias por citometria de fluxo. B) Análise *in vitro* do efeito da exposição do HTLV-1 em MSC. Nesta etapa, as MSC obtidas de indivíduos controle foram expostas ao HTLV-1 por condições distintas de cultivo: MSC foram cultivadas com células MT-2, utilizando um sistema *transwell*; MSC foram cultivadas com partículas de HTLV-1 e MSC foram cultivadas na presença de células MT-2 irradiadas. Em seguida, avaliamos a morfologia e ultraestrutura por microscopia de transmissão, o perfil imunofenotípico por citometria de fluxo e a capacidade de diferenciação em adipócitos e osteócitos. Por fim, investigamos a susceptibilidade das MSC a infecção por HTLV-1 *in vitro* por análises por citometria de fluxo, PCR e imunohistoquímica. C) Detecção de infecção pelo HTLV-1 em MSC de medula óssea de indivíduos HTLV-1⁺ e suas consequências. Nesta etapa, foram isoladas as células mononucleares da medula óssea (BMMC) e a partir destas, foram realizados ensaios de caracterização das BMMC por citometria de fluxo e o isolamento das MSC. As MSC foram caracterizadas quanto à expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo e capacidade de diferenciação em adipócitos e osteócitos. Em seguida, avaliamos a presença do HTLV-1 nestas células por citometria de fluxo, PCR, PCR em tempo real, ELISA e imunohistoquímica. Para determinar o perfil de expressão gênica global entre as MSC isoladas de indivíduos saudáveis e portadores do HTLV-1 foram realizadas análises de expressão gênica por meio de *microarray*.

1. Casuística

Foram utilizadas neste estudo amostras de sangue total de 27 indivíduos infectados pelo HTLV-1, os quais foram classificados de acordo com o estado clínico: 14 portadores assintomáticos (HAC) (7 mulheres e 7 homens; média de idade de $43,64 \pm 11,27$ anos) e 13 indivíduos com HAM/TSP (9 mulheres e 4 homens; média de idade de $53,85 \pm 12,14$ anos) (Apêndices 2 e 4). Para composição do grupo controle, foram obtidas 12 amostras de sangue (9 mulheres e 3 homens; média de idade de $41,92 \pm 13,22$ anos) oriundas de indivíduos sadios, candidatos a doação de sangue do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto (Apêndices 2 e 4). Após a coleta das amostras de sangue total, foi avaliada a contagem dos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$. Esses resultados podem ser observados em Apêndices 2 e 4.

Também utilizamos amostras de medula óssea (MO) de seis indivíduos infectados pelo HTLV-1, três HAC (média de idade de $64,00 \pm 12,12$ anos), e três HAM/TSP (média de idade de $59,33 \pm 1,52$ anos). As amostras de MO do grupo controle foram obtidas de três indivíduos sem infecção pelo HTLV-1 (média de idade de $31,5 \pm 10,60$ anos) (Apêndice 6). Todos os indivíduos HTLV-1⁺ foram provenientes do Centro Regional de Hemoterapia e do Ambulatório de Neurologia do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. O diagnóstico que define a presença ou ausência das manifestações clínicas associadas ao HTLV-1 foi determinado pelo corpo clínico desta instituição. Como critério de inclusão para o grupo HTLV-1⁺, foram coletadas apenas amostras de indivíduos que possuíam resultado de sorologia e reação em cadeia da polimerase (PCR) positiva para HTLV-1. Em relação ao grupo controle, foram incluídos indivíduos saudáveis e soronegativos para HTLV-1/2, recrutados dentre os doadores de medula óssea para transplante alogênico.

Além disso, utilizamos células estromais mesenquimais multipotentes humanas (MSC) obtidas de medula óssea. Estas células são remanescentes de projetos de pesquisa anteriores e estavam armazenadas no Banco de amostras do Laboratório de Terapia Celular do Centro Regional de Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo CRH-HC-FMRP-USP. Todas as amostras foram coletadas e utilizadas após o consentimento do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (processo nº 25000.208723/2010-66), seguindo as normas gerais da instituição.

2. Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto sob o número de processo 12462/2010 (Anexos 1 e 3). Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram informados quanto ao procedimento de coleta de amostra biológica, sua utilização no estudo e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos 2 e 4).

3. Coleta de amostras de sangue periférico e medula óssea

Foram coletados 4 a 20 mL de sangue periférico em tubos à vácuo com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (*EDTA Vacuette Greiner bio-one*) ou heparina sódica (*BD Vacutainer™ Becton Dickinson*). Este material foi utilizado para realização do hemograma, extração de DNA e separação de células mononucleares.

A coleta de 4 a 5 mL de MO foi realizada por punção da crista ilíaca posterior ou anterior, com material estéril, após antissepsia com iodopovidona degermante (*Riodeine®Rioquímica*) e anestesia local com lidocaína a 2% sem vasoconstritor (*Genérico Hipolabor*). Após a coleta, o material foi acondicionado em tubo com anticoagulante heparina sódica (*BD Vacutainer™ Becton Dickinson*). As amostras controle foram colhidas no bloco cirúrgico do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto unidade de transplante de medula óssea (TMO). Todas as punções de MO de indivíduos HTLV-1⁺ foram realizadas pela Dra. Maria do Carmo Favarin.

4. Hemograma

O hemograma foi realizado no equipamento COULTER® A^c.T diff^{TM} (*Beckman Coulter*). O parâmetro de interesse avaliado no hemograma foram os leucócitos totais, cujos valores de referência são 4,0 a 11,0 x 10³/mm³.

5. Sorologia para HTLV-1 e HTLV-2

As amostras dos indivíduos incluídos neste estudo foram submetidas ao ensaio imunoenzimático (EIA) *ORTHO HTLV-1/2 Ab-capture ELISA test system* (*Ortho Clinical Diagnostics INC.*), de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados são expressos por densidade ótica (D.O) e foram considerados reagentes e não reagentes

de acordo com o valor de corte estabelecido pelo Kit utilizado. Este ensaio foi realizado pelo Laboratório de Sorologia do Hemocentro de Ribeirão Preto.

6. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico e da medula óssea

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de medula óssea (BMMC) foram isoladas pelo método de gradiente de densidade utilizando o reagente *Ficoll Hypaque™ Plus* (GE Healthcare Life Science). Amostras de 20 mL de sangue periférico e 5 mL de MO foram coletadas de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e indivíduos controle em tubos contendo heparina sódica (*BD Vacutainer™ Becton Dickinson*). As amostras foram centrifugadas a 1.450 x g por 10 minutos para obtenção do plasma. Em seguida, as amostras foram diluídas na proporção 1:1(v/v) em tampão fosfato (PBS) 1X, pH 7,4 e aplicadas cuidadosamente sobre 15 mL de *Ficoll Hypaque™ Plus* (GE Healthcare Life Science). Para obtenção da camada de células mononucleares, as amostras foram centrifugadas a 900 x g durante 30 minutos em temperatura ambiente. As células presentes na interfase plasma- *Ficoll Hypaque™ Plus* (GE Healthcare Life Science) foram coletadas, lavadas duas vezes com 30 mL de PBS (1X), e o precipitado celular foi obtido por centrifugação a 335 x g durante 10 minutos. As células foram contadas em câmara de Neubauer e reservadas para seleção imunomagnética de linfócitos T CD4⁺ ou para criopreservação em soro fetal bovino inativado (*HyClone™*) contendo 10% de DMSO (v/v) (*Sigma-Aldrich*) e estocagem em nitrogênio líquido. As PBMC foram utilizadas em ensaios de co-cultivo e a partir das BMMC quantificamos as unidades formadores de colônias fibroblastóides (CFU-F) e isolamos células estromais mesenquimais multipotentes (MSC).

7. Separação imunomagnética de linfócitos T CD4⁺

Os linfócitos T CD4⁺ foram isolados a partir de PBMC por seleção positiva utilizando coluna imunomagnética LS (*Miltenyi Biotec*). Para isso, as amostras de PBMC foram centrifugadas a 200 x g por 10 minutos e ressuspensas em tampão de coluna contendo PBS (1X) pH 7,2 com 0,5% de albumina de soro bovino (BSA) e 2 mM de ácido citrato dextrose (ACD). Em seguida, as células foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD4 (*Miltenyi Biotec*) acoplados a microesferas magnéticas, de acordo com as instruções do fabricante. Após 15 minutos de incubação a 4°C, as células foram lavadas com 2 mL de tampão de coluna, centrifugadas a 500 x g durante

10 minutos a 4°C e ressuspensas em 500 µL do mesmo tampão. Esta suspensão celular foi cuidadosamente aplicada na coluna imunomagnética previamente ativada com 3 mL de tampão de coluna. As células marcadas com o anticorpo anti-CD4 ficaram retidas na coluna e as células não marcadas foram removidas após 3 etapas de lavagem com 3 mL de tampão de coluna. Para obtenção das células marcadas, a coluna foi retirada do campo magnético e acrescentou-se 5 mL de tampão de coluna. Estas células foram centrifugadas a 335 x g durante 10 minutos e ressuspensas em PBS (1X). A pureza da separação imunomagnética dos linfócitos T CD4⁺ foi avaliada por citometria de fluxo.

8. Isolamento e cultura de células MSC

As MSC humanas foram isoladas pela sua característica de adesão ao plástico e expansão, sem perda do potencial multipotente. Após a separação das células BMMC, a suspensão celular foi colocada em cultivo em garrafas de 75 cm² (*Greiner bio-one*) contendo meio α -MEM (*Gibco-BRL*) suplementado com 15% de soro fetal bovino (*HyClone*^{TM}), 200 mM/mL de L-glutamina (*Gibco-BRL*), 100 U/mL de penicilina (*Gibco-BRL*), 100 µg/mL de estreptomicina (*Gibco-BRL*), 2,4 g/L de Hepes (*Sigma-Aldrich*) e 2 g/L de bicarbonato de sódio (*Merck*). As células foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ por 7 a 25 dias para aderência das MSC. Após este período, o meio de cultivo foi substituído para remoção das células não aderentes. A cultura foi mantida até a confluência de 80 a 90%, quando as células foram colhidas com auxílio de solução de tripsina-EDTA (*Gibco*^{TM}).

9. Quantificação das CFU-F

Para determinação do potencial clonogênico das MSC, alíquotas de 2,5 x10⁵ e 5,0 x10⁵ de BMMC foram cultivadas em placas quadriculadas de 35 mm² (*Greiner bio-one*). As células foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO₂ por 15 dias para formação de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F). Após este período, foi realizada uma análise morfológica e quantitativa das CFU-F com auxílio de um microscópio de contraste de fase (*Olympus IX50*).

10. Linhagens celulares

MT-2 - Linhagem de célula T humana infectada pelo HTLV-1, derivada do co-cultivo de linfócitos T CD4⁺ de doadores saudáveis com células T de pacientes com ATLL (MIYOSHI et al., 1981).

HUT-102 - Linhagem de célula T humana infectada pelo HTLV-1, derivada de um paciente com micose fungoide (Linfoma não Hodgkin) (POIESZ et al., 1980).

HBMS - (linhagem de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea). Esta linhagem foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Dario Campana da University of Tennessee College of Medicine, Memphis, TN – EUA.

11. Cultura celular

A linhagem de células mesenquimais derivadas da medula óssea (HBMS) e as MSC foram cultivadas em meio α -MEM (*Gibco-BRL*) suplementado com 15% de soro fetal bovino (*HyClone*^{TM}), 200 mM/mL de L-glutamina (*Gibco-BRL*), 100 U/mL de penicilina (*Gibco-BRL*), 100 μ g/mL de estreptomicina (*Gibco-BRL*), 2,4 g/L de Hepes (*Sigma-Aldrich*) e 2 g/L de bicarbonato de sódio (*Merck*). A linhagem de célula T humana infectada por HTLV-1 (MT-2) e (HUT-102) foi expandida em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (*HyClone*^{TM}), 200 mM/mL de L-glutamina (*Gibco-BRL*), 100 U/mL de penicilina (*Gibco-BRL*), 100 μ g/mL de estreptomicina (*Gibco-BRL*), 2,6 g/L de Hepes (*Sigma-Aldrich*) e 2 g/L de bicarbonato de sódio (*Merck*). Todas as células foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂.

12. Detecção do HTLV-1 e HTLV-2 por PCR

12.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit Gentra Puregene Blood Kit (*Qiagen*) a partir de 4 mL de sangue coletados em tubos contendo EDTA (*EDTA Vacuette Greiner bio-one*) ou com 1 x 10⁶ células cultivadas. Para separação do *buffy coat*, as amostras foram centrifugadas a 900 x g durante 10 minutos na temperatura de 4°C. Em seguida, acrescentamos ao *buffy coat* 9 mL de tampão de lise de glóbulos vermelhos (*RBC Lysis Solution Buffer*) (*Qiagen*), e esta mistura foi homogeneizada por 15 minutos e posteriormente centrifugada a 2.000 x g durante 20 minutos. Ao *pellet* lavado, foi adicionado 3 mL de tampão de lise de glóbulos brancos (*Cell Lysis Solution*)

(Qiagen) e 15 µL de *RNase A solution* (Qiagen), seguido de homogeneização em vórtex e incubação a 37°C por 15 minutos. Após a incubação, acrescentamos 1 mL de solução precipitante de proteínas e agitamos vigorosamente por 30 segundos. A reação foi centrifugada a 2000 x g por 5 minutos e o sobrenadante límpido transferido para um tubo cônico de polipropileno de 15 mL contendo 3 mL de isopropanol absoluto. Após a homogeneização por inversão, a reação foi submetida à centrifugação a 2000 x g por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet* de DNA foi acrescentado 3 mL de etanol 70% seguido de centrifugação a 2000 x g por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o tubo com a amostra de DNA permaneceu secando por 5-10 minutos em temperatura ambiente e o DNA foi eluído em água estéril para ser estocado a -20°C. Todas as amostras de DNA foram quantificadas e diluídas para 0,1 µg/µL.

12.2 Amplificação do DNA proviral do HTLV-1 e HTLV-2 por PCR

Para a amplificação do DNA proviral do HTLV-1 e HTLV-2 foi realizada a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* para as regiões *tax* e *Ltr* do HTLV-1 e *Ltr* e *pxa* do HTLV-2 (Tabela 1). Para uma reação com volume final de 25 µL foram utilizados: 200 ng de DNA genômico; 0,2 mM de desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP) (*GE Healthcare Life Science*); 0,5 mM de cada *primer*; 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*), 2,5 µL do seu tampão (100 mM Tris-HCl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ e 0,01 % (m/v) gelatina) (*Invitrogen*); e água para completar o volume da reação. As reações foram amplificadas no termociclador *Veriti*® 96-Well Thermal Cycler (*Life Technologies*) de acordo com as seguintes condições de ciclagem: 94°C durante 2 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 56°C durante 1 minuto, 72°C durante 2,3 minutos. Finalmente, seguiu-se uma extensão final de 72°C durante 10 minutos. O produto obtido nesta primeira amplificação foi utilizado para reação de *nested*-PCR, utilizando o par de *primers* internos e as mesmas condições de ciclagem. Após o término das reações, o fragmento amplificado foi analisado em gel de agarose 1% corado com *GelRed* (*Biotium*).

Tabela 1. Sequência de *primers* utilizados para confirmação da infecção pelo HTLV pelo método de PCR.

Tipo Viral	Gene	Posição do <i>primer</i>	<i>Primer</i>	Sequência (5´- 3´)
HTLV-1	<i>tax</i>	Externo	<i>Tax</i> F	AGTCTACGTGTTTGGAGACTGTGT
			<i>Tax</i> R	TGTATGAGGCCGTGTGAGAG
		Interno	<i>Tax</i> F Nest	CGCCTACATCGTCACGCC
			<i>Tax</i> R Nest	AACATTGGTGAGGAAGGCCC
	<i>LTR</i>	Externo	LTR1 F	CACCCATTTTCCTCCCCATG
			LTR1 R	GGTCAGGCAAAGCGTGGA
Interno		LTR1 F Nest	CGTTGACGACAACCCCTCA	
		LTR1R Nest	AAGGCCCGGTCTCGACC	
HTLV-2	<i>LTR</i>	Externo	BSQF6	CAGGGCGAGTCATCGACCCAAAAG
			BSDR3	GAAGACAATGCTCCTAGGGCGGGC
		Interno	BSQF2	ACCGTCTCACACAAACAATCCC
			BSDR4	GCGGGCCTGCCTATAGCAATA
	<i>pxa</i>	Externo	px101	GGCAATCTCCTAAAATAGTCT
			px102	TGTGTGTAGGAACATTTTGTA
		Interno	px103	TTACAATCCTGTCTCCTCTCA
			px104	AAGTTCTTCTAATCGTTTTAG

12.3 Detecção do HTLV-1 e quantificação absoluta da carga proviral (CPV) por PCR em tempo real

A detecção do DNA proviral para o HTLV-1 por PCR em tempo real foi realizada pelo método TaqMan™ utilizando *primers* e sondas para os genes *tax* e *pol* do HTLV-1 (ROCHA-JUNIOR et al., 2014). A normalização da reação foi feita pela quantificação do gene endógeno β - globina (ROCHA-JUNIOR et al., 2014) ou β -actina (Hs03023880_g1). Para reação foram utilizados 5 μ M de cada *primer*, 4 μ M da sonda, 6,25 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix (*Life Technologies*) e 200 a 500 ng de DNA genômico. A reação foi amplificada no equipamento ABI Prism 7500 sequence detection System (*Life Technologies*) de acordo com as seguintes condições de ciclagem: 50°C durante 2 minutos, 95°C durante 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Para quantificação da CPV, inicialmente construímos uma curva padrão utilizando o DNA da linhagem MT-2 que contém 2,4 cópias do gene *tax* por célula (ALBRECHT et al., 1998). Considerando esta informação e sabendo a quantidade exata de células, foi possível obter diluições seriadas (10^1 a 10^5 cópias do gene *tax*/ μ L). Todas as amostras foram testadas em duplicata.

A reação de quantificação por PCR em tempo real fornece o valor de *cycle threshold* (C_T), cujo significado relaciona-se ao ciclo (valor absoluto) em que a amostra atinge limiar de detecção (*threshold*) de fluorescência comum às outras amostras. Os valores de C_T são proporcionais ao logaritmo negativo da quantidade inicial de DNA (GIBSON et al., 1996). A cada ciclo, o dobro de *amplicon* é formado e, quando são realizadas as diluições seriadas, devem ser mantidas diferenças proporcionais entre os C_T . O cálculo da CPV é realizado por regressão linear com os valores da curva padrão obtido com a média de amplificação do gene alvo e do gene endógeno. A partir da média da quantidade destes genes utiliza-se a fórmula: $CPV (n^\circ \text{ cópias}/10^5 \text{ células}) = n^\circ \text{ de cópias de } tax / n^\circ \text{ de cópias de } \beta\text{-actina} \times 2 \times 100.000$ para a determinação da CPV.

13. Sequenciamento de DNA

Para o sequenciamento foi utilizado o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Life Technologies), conforme as especificações do fabricante. A reação consistiu em 2 μL de tampão de sequenciamento 5X (concentração final 1X), 2 μL de *BigDye® Terminator v3.1*, 1 μL de *primer forward* ou de *primer reverse* a 2,5 μM (concentração final 0,25 μM), 1 μL de produto de PCR e 4 μL de água livre de RNase para obtenção de um volume final de 10 μL . A reação foi incubada em termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Life Technologies) sob as seguintes condições: 95°C por 1 minuto; 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 minutos; e manutenção final da reação em 4°C. Em seguida, a precipitação do produto do sequenciamento do DNA foi realizada com a adição de 30 μL de água Milli-Q e 60 μL de isopropanol absoluto seguido de incubação por 20 minutos em temperatura ambiente. O DNA precipitado foi obtido através de centrifugação a 3200 x g durante 45 minutos. Após descartar o sobrenadante, o DNA precipitado foi lavado com 200 μL de etanol 70% (v/v) gelado. A amostra foi centrifugada a 3200 x g por 20 minutos e o etanol foi removido através de *spin* invertido da placa. Em seguida, o DNA foi mantido em estufa a 37°C, por 15 minutos, para secagem. As amostras foram ressuspensas em *Hi-Di Formamida* (Life Technologies), desnaturadas a 95°C por 3 minutos e aplicadas no sequenciador automático *ABI 3500xL Genetic Analyzer* (Life Technologies).

Os eletroferogramas obtidos foram analisados no *software 3500 Data Collection* e posteriormente convertidos em sequências de nucleotídeos por meio do *software DNA Sequencing Analysis Versão 5.4*. A montagem das sequências consenso foi realizada

pelo *Software BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.0.9.0 e estas foram analisadas por *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

14. Concentração do HTLV-1 e ensaio de infecção viral

A concentração do HTLV-1 foi determinada de acordo com o seguinte protocolo. As células MT-2 (1×10^7) foram cultivadas em meio RPMI completo durante 24 horas. O sobrenadante viral foi recolhido, filtrado através de um filtro de 45 μ M (*Millipore*), e ultracentrifugado a 10.000 x g durante 2 h. O vírus concentrado foi quantificado através do ensaio imunoenzimático para p19 (EIA) (*ZeptoMetrix Corporation*) de acordo com as instruções do fabricante e armazenado a -80°C . A capacidade de infecção do HTLV-1 nas MSC foi examinada usando vírus concentrado e ensaios de co-cultura. As MSC ($2,5 \times 10^3$) entre a 3ª a 5ª passagem foram cultivadas em placas com 6 poços por 24 horas. O HTLV-1 concentrado (100 ng) foi adicionado à cultura de MSC e mantido por 18 horas. Para o ensaio de co-cultivo, as MSC foram cultivadas em meio RPMI completo a 37°C durante 18 h com células MT-2 irradiadas (60.000 Gy) na proporção de 1:1 ou com células MT-2 em um sistema *transwell* de 0,4 μ m (*Greiner bio-one*). Como controle, mantivemos células no mesmo meio, sem a adição de vírus. Esses ensaios foram repetidos pelo menos três vezes, e os resultados foram calculados como médias $\pm$ SEM de triplicatas.

Ensaio de co-cultivo com MSC isoladas de indivíduos com HTLV-1 e PBMC ou linfócitos T CD4⁺ obtidos de indivíduos controle foram realizados para avaliar a habilidade das MSC em transmitir o HTLV-1. Para esta análise, as MSC HTLV-1⁺ ($2,5 \times 10^3$) foram co-cultivadas com PBMC ou linfócitos T CD4⁺ controle na proporção (1:1) durante 5 dias. Após este período as PBMC e linfócitos T CD4⁺ foram coletados para extração de DNA.

15. Análises por citometria de fluxo

15.1 Contagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺

A contagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi realizada por citometria de fluxo utilizando no equipamento *FACSCalibur* e software *MultiSET* (*Becton Dickinson*). Para a imunofenotipagem, foram adicionados 20 μ L do reagente *mulTest* CD3-FITC/CD4-

PE/CD45-PerCP/CD4-APC e 50 μ L de sangue total em um tubo com o reagente *TruCount* (*Becton Dickinson*). A amostra foi incubada durante 15 minutos no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 450 μ L de solução de lise *FACS Lysing Solution* (1X) (*Becton Dickinson*) e a mistura foi homogeneizada e incubada durante 15 minutos para a análise. No citômetro de fluxo, as células passam frente a um feixe de luz (*laser*), que sofre um desvio de acordo com as características de cada célula. Este desvio é captado pelos detectores *Forward Light Scatter* (*FSC*), que reflete o tamanho celular e o *Side Scatter* (*SSC*), a granularidade ou complexidade citoplasmática. Os detectores (*FSC* e *SSC*) são ajustados para acomodar populações heterogêneas de células presentes na amostra e para exclusão de células mortas. Quando o *laser* incide sob a célula marcada por um fluorocromo, causa a sua excitação e consequente emissão de ondas luminosas de diferentes comprimentos (cores diferentes), que são filtradas por um sistema óptico e detectadas por células fotomultiplicadoras. As variáveis são representadas sob as forma de histogramas, ou gráficos de pontos (*Dot plots*).

15.2 Seleção celular (*Sorting*)

Após o co-cultivo com HBMS, as células MT-2 foram coletadas, marcadas com os anticorpos anti-CD4(PE) e anti-CD13(APC) e selecionadas uma a uma automaticamente pelo aparelho *FACSaria* (*Beckton Dickinson*). Esta análise permitiu a exclusão das células HBMS (CD13⁺) e seleção das células MT-2 (CD4⁺) que posteriormente foram encaminhadas para análise da expressão gênica.

15.3 Caracterização imunofenotípica das MSC

As MSC infectadas ou não foram coletadas após o tratamento com solução de tripsina-EDTA (*Gibco*^{TM}) por quatro minutos a 37°C. Em seguida, foi realizada a inativação da tripsina pela adição de 2 a 3 vezes o volume de meio de cultura contendo 10% de soro fetal bovino. As células foram lavadas duas vezes com tampão PBS (1X) por centrifugação a 400 x g durante 10 minutos e contadas em câmara de *Neubauer*. Aliquotas com 1 x 10⁵ MSC foram marcadas com os anticorpos específicos para as moléculas de superfície: CD14-PE, CD45-FITC, CD54-PE, CD51/61-FITC, CD44-FITC, CD29-APC, HLA-DR-FITC, HLA-ABC-PE, CD106-FITC, CD73-PE, CD105-PerCP, CD166-PE, CD146-PE, CD31-FITC, CD49e-PE, CD34-APC, CD13-APC e

CD90-FITC (*Becton Dickinson*) e mantidas por 15 minutos no escuro. Após este período, as células foram lavadas com PBS (1X) e centrifugadas a 400 x g por 10 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram descartados, e as células foram fixadas em tampão PBS contendo 1% de paraformaldeído e armazenadas a 4°C no escuro até a análise em citômetro de fluxo (*FACSCalibur - Becton Dickinson*).

15.4 Caracterização das subpopulações celulares

O fenótipo e a frequência de algumas subpopulações linfocitárias foram avaliadas após cinco dias de co-cultivo com as MSC. As células co-cultivadas foram marcadas com 5 µL de cada anticorpo: CD4-PerCP, CD3-APC, CD25-FITC, CD8-PerCP e HLAG-PE (*Becton Dickinson*). A reação foi incubada por 15 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. As células foram lavadas com 2 mL de PBS (1X) seguida por centrifugação a 600 x g por 3 minutos. A seguir, as células foram incubadas com 1 mL de solução de lise *FACS Lysing Solution* (1X) (*Becton Dickinson*) por 10 minutos e após a centrifugação a 600 x g por 3 minutos, foi adicionado 300 µL de tampão de permeabilização *FACS Permeabilizing Solution 2* (10X) (*Becton Dickinson*) e 5 µL do anticorpo intracelular Foxp3-PE(*Becton Dickinson*). Após 10 minutos de incubação, as células foram lavadas com 2 mL de PBS (1X) e centrifugadas a 600 x g por 3 minutos. Por fim, as células foram ressuspensas e avaliadas por citometria de fluxo.

15.5 Análise da expressão intracelular da proteína viral TAX

Para detecção da proteína viral TAX, $2,5 \times 10^5$ células precipitadas foram ressuspensas em 100 µL de PBS (1X) com 4% de paraformaldeído (v/v) (*Sigma-Aldrich*). A solução foi incubada por 20 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. As células foram centrifugadas a 1.000 x g por 3 minutos para lavagem com PBS (1X) contendo 4% de soro de cabra (v/v) (*Sigma-Aldrich*). Ao precipitado celular foram adicionados 100 µL de PBS com 0,1% de Triton X (v/v) (*Sigma-Aldrich*) para permeabilização celular. Após sete minutos, as células foram lavadas com PBS contendo 4% de soro de cabra (v/v) (*Sigma-Aldrich*) e centrifugadas a 600 x g por três minutos. Ao término da lavagem, foram adicionados 100 µL dos anticorpos primários anti-Tax (gentilmente cedidos por Dr. Yuetsu Tanaka, *University of the Ryukyus, Okinawa, Japão*), diluído 1:1000 em PBS contendo 4% de soro de cabra (v/v) (*Sigma-*

Aldrich). A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e centrifugada a $600 \times g$ por três minutos com PBS contendo 4% de soro de cabra (v/v) (*Sigma-Aldrich*) para retirada do excesso de anticorpos. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de anticorpo secundário anti-IgG3 diluído 1:1000 em PBS contendo 4% de soro de cabra (v/v) (*Sigma-Aldrich*). A placa foi incubada durante 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após esse período, a placa foi lavada com PBS contendo 4% de soro de cabra (v/v) (*Sigma-Aldrich*) por centrifugação a $600 \times g$ por três minutos. O anticorpo secundário é conjugado com o fluorocromo Alexa Fluor 488, que emite fluorescência no comprimento de onda de 530nm. Desta forma, as amostras foram avaliadas por citometria de fluxo.

15.6 Ensaio de proliferação de linfócitos T

Para avaliar a modulação da linfoproliferação por MSC, utilizamos o método de marcação com *carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester* (CFSE) (*Invitrogen*) para análise por citometria de fluxo. A suspensão de PBMC proveniente de indivíduos controle ou infectados pelo HTLV-1 foi centrifugada a $400 \times g$ por 10 minutos a 4°C e ressuspendida em PBS (1X). Em seguida, as células foram marcadas com CFSE (*Invitrogen*) e incubadas durante 10 minutos a 37°C . Após este período, as células foram lavadas duas vezes com 40 mL de RPMI 1640 (*Gibco*) com 5% de soro fetal bovino (*HyClone*^{TM}) a partir de centrifugação a $335 \times g$ por 10 minutos a 4°C . As células marcadas foram ressuspendas na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/mL utilizando o meio RPMI 1640 (*Gibco-BRL*) com 10% de soro fetal bovino (*HyClone*^{TM}). A seguir, a suspensão celular foi dividida em duas partes: uma com adição do mitógeno fitohemaglutinina (PHA) (*Sigma-Aldrich*) na concentração de $0,5 \mu\text{g/mL}$ e a outra sem adição de PHA. Alíquotas com 1 mL da suspensão celular foram cultivadas em placas de 24 poços (*Greiner bio-one*) na presença ou ausência de MSC previamente aderidas em diferentes concentrações. Como controle do ensaio, foram cultivadas células na ausência de MSC em três condições diferentes: PBMC não marcadas com CFSE, PBMC marcadas com CFSE e não estimuladas com PHA e PBMC marcadas com CFSE e estimuladas com PHA. Todas as células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 durante cinco dias. No quinto dia de co-cultivo, as PBMC foram coletadas, marcadas com anticorpos anti-CD3(PerCP) e anti-CD4(APC) ou anti-CD8(APC)

(*Becton Dickinson*) e analisadas por citometria de fluxo para avaliação da porcentagem de proliferação através da diminuição da intensidade de fluorescência do CFSE.

16. Ensaio de imunohistoquímica

Alíquotas com 2×10^4 de MSC ou MT-2 foram plaqueadas em lamínulas de vidro (*GoldLab*), cultivadas em placas de 24 poços (*Corning*) e incubadas até atingirem uma confluência de 80%. Passado este período, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% (*Merck*) por 20 minutos em temperatura ambiente, lavadas três vezes com PBS (1X) e permeabilizadas com 0.2% de Triton X-100 (*Sigma–Aldrich*) por 1 hora em temperatura ambiente. Como solução de bloqueio para evitar ligações inespecíficas do anticorpo, foi utilizada uma solução contendo 5% de BSA e 2% de soro de cabra diluído em PBS (1X). Após 1 hora de incubação, as amostras foram marcadas com anticorpo primário anti-HTLV-I p19 (*Abcam Inc.*) ou anti-CD73 (*BD Pharmingen*) em temperatura ambiente durante toda a noite. A seguir, foi utilizado o anticorpo secundário anti-mouse Alexa Fluor 488 (*Invitrogen*) e os núcleos foram corados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (*Vysis*). As células foram visualizadas usando um microscópio confocal *laser scanning (CLSM) (LSM 710; Carl Zeiss)* nas lentes objetivas com aumento de 20 e 63 vezes em óleo de imersão e abertura numérica de 1.4. Um laser de argônio de 488nm foi usado para excitar os anticorpos secundários e a emissão foi medida a 525nm. A visualização da luz para cada excitação de comprimento de onda foi gravada no modo *multitracking* usando canais de detecção separados. A análise das imagens foi realizada usando *CARL ZEISS ZEN 2008 software (Carl Zeiss)*. Os controles negativos foram capturados usando os mesmos padrões descritos.

17. Microscopia de transmissão

As MSC co-cultivadas com células MT-2 por 18 horas foram fixadas em uma solução contendo 2% de glutaraldeído, 2% de paraformaldeído 0,1 M (pH 7,2), tampão cacodilato suplementado com 5 mM de $MgCl_2$, 5 mM de $CaCl_2$, e 0,1 M de sacarose por 2 horas em temperatura ambiente. Os filtros foram lavados 3 vezes em tampão de cacodilato e fixados durante 1 hora à temperatura ambiente em uma solução com 1% de tetróxido de ósmio. As amostras foram lavadas três vezes em água e incubadas em 0,5% de acetato de uracila. A seguir, as células foram desidratadas em um gradiente de etanol (25 a 100%) e embebidas em resina epóxi a 60°C durante 48 horas. Após duas etapas de

lavagem com óxido de propileno por 10 minutos, foram realizadas secções ultrafinas usando micrótomo (*Leica Ultracut S.*). Em seguida, as secções foram examinadas usando microscópio eletrônico (*JEOL JEM-100 CX II*). Todas as análises de microscopia de transmissão foram realizadas pelo Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

18. Detecção de citocinas e proteína viral p19 por ensaio imunoenzimático

A quantificação da proteína viral p19 e da citocina IL-6 foram realizadas pelo método ELISA utilizando o kit *HTLV-1 p19 Antigen ELISA* (ZeptoMetrix) e (*R&D Systems*) respectivamente. Antes do ensaio, foi construída uma curva-padrão utilizando o antígeno HTLV-1 nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 400 e 800 pg/mL. Em seguida, as amostras de sobrenadante de cultura foram diluídas 1:10 em tampão de lise. Os poços da placa de ELISA foram lavados três vezes com o tampão de lavagem, e então foi adicionado o antígeno HTLV-1 (curva-padrão) ou 200 µL das amostras de sobrenadante de cultura para a quantificação. Após incubação por 2 horas à temperatura ambiente, repetimos o procedimento de lavagem da placa, e adicionamos 100 µL/poço do anticorpo de detecção diluído em tampão de bloqueio, conforme recomendação do fabricante. Após as sucessivas lavagens e secagem da placa, acrescentamos 100 µL/poço de solução de peroxidase e incubamos por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, adicionamos 100 µL de solução de substrato e incubamos por 30 minutos. Neste momento, uma coloração azul é evidenciada, indicando a presença do antígeno viral p19. A reação foi bloqueada adicionando 100 µL/poço de solução de bloqueio, ocasionando a mudança de cor azul por amarela. A densidade óptica (D.O.) foi avaliada em leitor de microplacas em 450 nm (*µQuant, Bio-Tek Instruments Inc.*). Os valores de absorbância obtidos foram comparados com a curva padrão para estimar a concentração de citocinas ou p19 em cada amostra.

19. Diferenciação em adipócitos e osteócitos

A diferenciação foi realizada como descrito anteriormente por (CASTILHO-FERNANDES et al., 2011). Basicamente, a diferenciação foi induzida depois da incubação com meios de diferenciação específicos para adipócitos (α -MEM (*Gibco-Invitrogen*) suplementado com 15% SFB (*Thermo Cientific HyClone*), 1 mM de

dexametasona (*Sigma-Aldrich*), 2,5 mg/mL de insulina, e 0,5 mM de isobutilmetilxantina (*Sigma-Aldrich*), e para osteócitos α -MEM (*Gibco-Invitrogen*) suplementado com 7,5% de SFB (*Thermo Scientific HyClone*), 0,1 mM de dexametasona (*Sigma-Aldrich*), 20 mM de ácido ascórbico e 1 M de β -glicerofosfato (*Sigma-Aldrich*). Os meios foram substituídos a cada três dias consecutivos durante um período de 22 dias. Depois deste período, as células foram fixadas e coradas pelo método de von Kossa (para observação da deposição de cálcio), ou com Sudan II e Scarlet (para observação do acúmulo de gordura). As células controle foram mantidas em meio α -MEM (*Gibco-Invitrogen*), com 7,5% de soro fetal bovino (*Thermo Scientific HyClone*) pelo mesmo período de tempo. As células foram analisadas no microscópio *AxioScope 2.0 Zeiss* equipado com *AxioCam HR (Carl Zeiss)*.

20. Extração do RNA total

O RNA total foi extraído utilizando *RNeasy mini kit (Qiagen)* segundo instruções do fabricante. Após precipitação, o RNA extraído foi diluído em água e estocado a -80°C . O RNA foi quantificado e avaliado quanto à integridade e pureza por meio da análise em gel de agarose e leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A partir do RNA total, sintetizamos o DNA complementar (cDNA).

21. Reação de Transcrição Reversa

O RNA total foi transcrito em cDNA utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies)*, segundo as instruções do fabricante. Para um volume final de 50 μL foram utilizados 5,0 μL de tampão RT (10X), 4,0 μL de mix de dNTP (100mM), 5,0 μL de *random primers* (10X), 0,15 μL de *RNAse out*, 125U da enzima *multiScribe® MuLV reverse transcriptase*, 2 μg de RNA e água DEPC suficiente para ajustar o volume. A reação foi transcrita no termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Life Technologies)* de acordo com as seguintes condições de ciclagem: 25°C durante 10 minutos seguida por 37°C por 120 minutos. Após a transcrição, o cDNA foi estocado a -20°C .

22. Quantificação e validação por RT-PCR

Para a quantificação da expressão gênica e validação dos resultados obtidos, foi utilizada a reação de PCR em tempo real pelo método SYBR™ Green ou TaqMan™ *Gene Expression Assay* (Life Technologies) e plataforma *ABI 7500 sequence detection* (Life Technologies). Nas reações pelo método SYBR™ Green utilizamos 3,75 µL de SYBR® Green PCR Master Mix (2X), 1 µL de cada primer (5 mM) (Tabela 2), 2 µL de cDNA diluído 1:10 (v/v) e água DEPC suficiente para um volume final de 15 µL de reação. A reação de amplificação foi conduzida conforme especificações do fabricante.

Nos ensaios de expressão gênica utilizando a metodologia TaqMan™ foram utilizadas sondas específicas para os genes *pol* e *tax* do HTLV-1 (ROCHA-JUNIOR et al., 2014), *RUNX2* (Hs00231692_m1), *VCAM-1* (Hs00174239_m1), *ICAM-1* (Hs00164932_m1), *PGE2* (Hs00610420_m1), *IDO* (Hs00984148_m1) e *LGALS1* (Hs00355202_m1) (*Life technologies*). A normalização da reação foi feita pela quantificação do gene endógeno β 2- microglobulina (4333766-0710013), *ACTB* (4326315E) e/ou *GAPDH* (4310884-E) (*Life technologies*). Na reação utilizamos 5,0 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (2X), 0,5 µL de sonda específica (20X), 2 µL de cDNA diluído 1:10 (v/v) e água DEPC suficiente para um volume final de 10 µL de reação. Todas as reações foram realizadas em duplicata e o nível de expressão dos genes foi calculado pelo método de unidades relativas de expressão (URE) descrito por ALBESIANO et al., 2003.

Tabela 2. Sequência de *primers* utilizados para análise da expressão gênica por PCR em tempo real utilizando o método SYBR™ Green.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')
NRP1	Forward	CCTGAATGTTCCCACTACACAA
	Reverse	CAACA TCAGGGAATCC ATCCC
HSPG2	Forward	TGGACACATTCGTACCTTTCTGA
	Reverse	ACTCCGACTCCAGCGTGT CT
GLUT-1	Forward	ATGGAGC CAGCAGCAAGAA
	Reverse	AGGGACCAGAGCGTGGTGAG
ADIPO	Forward	GGTG AGAAAGGAGATCCAGGT
	Reverse	CTTGGATTCCCGGAAAG CCTC
PPAR γ	Forward	TCCCGCTGACCAAAGCAAG
	Reverse	CAGGGGGGTGATGTGTTTGA
ACTB	Forward	GCCCTGAGGCACTCTTCCA
	Reverse	CCAGGGCAGTGATCTCCTTCT
GAPDH	Forward	GCCTCAAGATCATCAGCAATGC
	Reverse	CATGGACTGTGGTCATGAGTCCT

23. Análise de expressão gênica global pelo método de *microarray*

A análise do perfil de expressão gênica das MSC isoladas de indivíduos HAC e HAM/TSP foi realizada por meio da plataforma comercial Agilent® de *microarrays* de oligonucleotídeos utilizando o kit *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis (Low Input Quick Amp Labeling)* (G4851B - Agilent Technologies).

A técnica de *microarray* consiste basicamente na hibridização por complementariedade dos ácidos nucleicos a pequenos oligonucleotídeos marcados por fluorocromos que estão aderidos em posições específicas na lâmina de *microarray*. Estas sequências similares as dos genes de interesse representam às sequências dos RNA mensageiro (mRNA).

23.1 Preparação dos *Spikes*

Para garantir a qualidade da técnica de *microarray* são utilizados controles positivos, denominados *spikes*. Estes são sequências de RNA responsáveis por monitorar todo experimento, desde a amplificação da amostra até a marcação e o processamento dos dados.

Inicialmente, o tubo contendo o estoque dos *spikes* foi aquecido a 37°C durante 5 minutos e o tampão de diluição foi aquecido a 80°C durante 3 minutos. Em seguida, foram feitas três diluições: 1:20 (2,0 µL da solução estoque + 38,0 µL de tampão de diluição); 1:25 (2,0 µL da primeira diluição + 48,0 µL de tampão de diluição); 1:10 (4,0 µL da segunda diluição + 36,0 µL de tampão de diluição). As amostras foram homogeneizadas entre as diluições.

23.2 Reação de marcação

Para a marcação das amostras, o volume do RNA foi ajustado com água livre de RNase para um volume de 1,5 µL em tubos de 0,5 µL, mantendo a concentração de 200 ng. Em seguida, foram adicionados 2,0 µL de *spike* (terceira diluição), 0,8 µL de *primer* promotor T7 e 1 µL de água livre de RNase, perfazendo um volume final de 5,3 µL. A reação foi incubada a 65°C durante 10 minutos para a desnaturação dos *primers* e das amostras. Em seguida, incubou-se durante 5 minutos em gelo.

A reação de transcrição reversa foi realizada acrescentando aos tubos 2,0 µL de tampão de primeira fita (5X), 1,0 µL de ditiotretitol 0,1M (DTT), 0,5 µL de mix de dNTP (10 mM) e 1,2 µL do reagente *Affinity Script RNase Block Mix*. Posteriormente,

as amostras foram incubadas a 40°C durante 2 horas e 70°C durante 15 minutos. Após incubação, as amostras foram armazenadas a -80°C por 24 horas.

A reação de marcação do cRNA foi realizada após a síntese da primeira fita. Inicialmente, foram adicionados aos tubos 0,75 µL de água livre de RNase, 3,2 µL de tampão de transcrição (5X), 0,6 µL de DTT a 0,1M, 1,0 µL de mix de NTP, 0,21 µL da enzima RNA polimerase T7 e 0,24 µL de CTP marcada com cianina (Cyanine 3-CTP). Incubou-se a 40°C durante 2 horas. Ao fim da marcação, as amostras foram submetidas à purificação (RNA *cleanup*).

23.3 RNA Cleanup

O volume das amostras de cRNA foi ajustado para 100 µL e as mesmas foram submetidas à purificação usando o kit *RNeasy Mini Kit (Qiagen)*. Adicionou-se 350 µL de tampão RLT, homogeneizou-se bem e acrescentou-se 250 µL de etanol. O volume total foi transferido para a coluna *RNeasy Mini spin* e centrifugou-se a 14.500 x g durante 30 segundos. Em seguida, o eluído foi desprezado e adicionou-se 500 µL do tampão RPE. A coluna foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e novamente o eluído foi descartado. Outra vez, o tampão RPE foi adicionado e centrifugou-se a 14.500 x g durante 1 minuto. O eluído foi descartado e centrifugou-se a 14.500 x g durante 30 segundos para garantir que todo o tampão RPE foi desprezado. Adicionalmente, a coluna foi transferida para um tubo *ependorf* de 1,5 mL e acrescentou-se 30 µL de água livre de RNase para eluição do cRNA retido na coluna. A coluna foi incubada por 1 minuto em temperatura ambiente e centrifugada a 14.500 x g durante 30 segundos. O cRNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro.

23.4 Quantificação do cRNA

A incorporação do fluorocromo cianina foi quantificada no equipamento *NanoDrop (NanoDrop, Thermo scientific)*. Foram determinados os seguintes parâmetros: concentração do fluorocromo cianina 3 (pmol/µL) e concentração de cRNA (ng/µL). A quantidade total de cRNA foi calculada com a seguinte fórmula: cRNA (µg) = cRNA x 30 / 1.000, e para a atividade específica da cianina utilizamos o cálculo: Atividade específica da cianina (pmol Cy3/µg RNA) = [cianina] x 1.000/[cRNA]. O valor adequado para quantidade total de cRNA é superior a 600 ng e para atividade específica da cianina são aceitos valores acima de 6,0 pmolCy3/µg cRNA.

23.5 Hibridização

A reação de hibridização foi realizada adicionando-se a um tubo de 1,5 mL: 600 ng de cRNA, 5,0 µL de agente bloqueador (10X), 1,0 µL de tampão de fragmentação (25X) e água livre de RNase para um volume final de 25,0 µL. Após incubação a 60°C durante 30 minutos para a fragmentação do cRNA, as amostras foram colocadas no gelo durante 1 minuto e acrescentou-se 25 µL de tampão de hibridização Hi-RPM GEx (2X).

As lâminas de *microarray* foram hibridizadas com o auxílio de uma lâmina vedadora denominado *gasket* e uma câmara de hibridização nomeada *chamber*. A *gasket* foi posicionada na *chamber* e as amostras foram adicionadas lentamente no centro dos poços da *gasket*. Em seguida, após a lâmina de *microarray* ser colocada de maneira invertida sobre a *gasket*, a *chamber* foi fechada para incubação em forno de hibridização a 65°C, durante 17 horas, 10 rpm.

23.6 Lavagem das lâminas de *microarray*

As lâminas de *microarray* foram lavadas após a hibridização para assim serem escaneadas. Foram preparadas 5 cubas para a lavagem: duas contendo o tampão de lavagem 1, uma cuba contendo tampão de lavagem 2 aquecido a 37°C, uma contendo acetonitrila e outra contendo solução de estabilização e secagem. Posteriormente, a *chamber* foi retirada do forno e após ter sido aberta, a *gasket* foi removida com lâmina de *microarray* a qual foi transferida para a primeira cuba. Em seguida, a lâmina de *microarray* foi transferida para a segunda cuba e agitou-se por 1 minuto com auxílio de agitador magnético. A lâmina foi transferida para a terceira cuba que continha o tampão 2 e agitou-se nas mesmas condições anteriores. Ainda, a lâmina foi transferida e incubada na quarta cuba contendo acetonitrila durante 10 segundos, seguida da incubação na quinta cuba contendo a solução de estabilização e secagem durante 30 segundos. Finalmente, a mesma foi retirada da cuba, armazenada sob abrigo da luz e escaneada imediatamente.

23.7 Escaneamento das lâminas de *microarray*

As lâminas foram escaneadas usando o equipamento *Agilent Microarray Scanner* (*Agilent Technologies*). Os dados foram analisados através do *software Agilent feature extraction* versão 10.7.3 (*Agilent Technologies*). Este *software* permite o reconhecimento dos *spots*, que são pontos específicos nos quais estão aderidos os oligonucleotídeos. Em

seguida, foi gerado um relatório com diversos parâmetros que estão relacionados com a qualidade dos *microarrays*.

23.8 Análise dos resultados

Após o escaneamento e a quantificação da intensidade de fluorescência de cada *spot* realizou-se a normalização dos *microarrays* com o objetivo de tornar as diferentes lâminas comparáveis entre si. O controle de qualidade, a normalização e os parâmetros utilizados para filtrar os dados dos *microarrays* foram realizados utilizando o conjunto de algoritmos contidos no pacote *Limma*, disponível em <http://bioconductor.org/>.

A expressão diferencial de genes individuais foi analisada com o *teste t* moderado de um modelo linear e um método Bayesiano empírico implementado no pacote *Limma*. Os diferentes grupos (HAC e HAM/TSP) foram comparados entre si e os genes que possuíam 2-fold e *p* com valor $< 0,005$ foram selecionados.

24. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados aplicando *Mann-Whitney test*, *one-tail* usando *GraphPad InStat software*, versão 3.0 para Windows (*GraphPad Software*; www.graphpad.com) e foram considerados significantes os dados com $p \leq 0,05$.

IV. RESULTADOS

1. Imunorregulação em linfócitos T infectados pelo HTLV-1 por MSC

1.1 Caracterização morfológica, imunofenotípica e plasticidade celular das MSC isoladas de indivíduos controles

As MSC provenientes da medula óssea de indivíduos controles utilizadas neste trabalho foram avaliadas quanto à morfologia, expressão dos marcadores de superfície (CD90, CD73, CD105, CD106, CD45, CD34, CD14, CD31) e plasticidade celular. Todas as amostras de MSC apresentaram morfologia fibroblastóide, expressão dos marcadores CD90 ($98,22 \pm 0,59\%$), CD73 ($90,78 \pm 7,29\%$) e CD105 ($90,65 \pm 6,14\%$) e foram negativas para os marcadores CD45 ($1,13 \pm 1,24\%$), CD34 ($0,35 \pm 0,25\%$), CD14 ($0,99 \pm 1,38\%$) e CD31 ($0,90 \pm 0,42\%$) (Apêndice 1). A análise da plasticidade celular revelou que todas MSC foram capazes de se diferenciar em adipócitos e osteócitos (Figura 5).

Figura 5. Plasticidade das MSC isoladas da medula óssea de indivíduos controles. A) Análise morfológica das células mesenquimais estromais da medula óssea (MSC) indiferenciadas e coradas com hematoxilina/eosina (aumento 100X); B) Diferenciação celular das MSC em adipócitos após coloração com Sudan II-escarlata (aumento 100X); C) MSC diferenciada em osteócito após coloração de *von Kossa* (aumento 100X).

1.2 Potencial de imunorregulação das MSC sobre linhagens de linfócitos infectados pelo HTLV-1

Para investigar a capacidade das MSC humanas em modular a expressão do gene *tax* do HTLV-1, as células HBMS (linhagem de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea) foram co-cultivadas com as células MT-2 (linhagem de célula T humana infectada por HTLV-1) por um período de tempo de 24, 48 e 72 horas. Após o co-cultivo, as células MT-2 foram isoladas por citometria de fluxo (*sorting*) utilizando a marcação com os anticorpos anti-CD4 e anti-CD13, o que possibilitou a separação das células CD4⁺ e a

exclusão de células MSC (CD13⁺). Apenas as amostras com pureza superior a 97% foram submetidas à extração de RNA total seguida da avaliação da expressão do gene *tax* por PCR em tempo real. A quantificação por PCR em tempo real mostrou que as células MT-2 que foram co-cultivadas com as células HBMS por um período de 48 horas, apresentaram uma expressão significativamente menor do mRNA do gene *tax* do HTLV-1 ($p=0,014$), quando comparadas com as células MT-2 cultivadas na ausência de células HBMS. Entretanto, para os períodos de 24 e 72 horas de co-cultivo não foram observadas diferenças significativas (Figura 6).

Figura 6. Expressão do mRNA do gene *tax* do HTLV-1. Quantificação por PCR em tempo real da expressão do gene *tax* em células MT-2 cultivadas sozinhas e co-cultivadas com HBMS por um período de 24, 48 e 72 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata (médias $\pm$ SEM) e para análise estatística foi utilizado *Mann-Whitney test* considerando significantes os valores com $p \leq 0,05$. Os resultados estão representados em unidades relativas de expressão (URE).

O próximo passo foi avaliar se o efeito de inibição observado na expressão do gene *tax* também poderia ser demonstrado na secreção da proteína p19 do HTLV-1. Para este experimento, foram coletados os sobrenadantes das células MT-2 submetidas ou não ao co-cultivo com HBMS durante 24, 48 e 72 horas. Nossos resultados mostraram que a expressão da proteína p19 foi 1,3 vezes menor nas células MT-2 que foram co-cultivadas com HBMS em todos os três períodos de tempo (Figura 7A). Resultados similares de menor expressão da proteína p19 (1,3 vezes menor) também foram obtidos no co-cultivo das células MT-2 com MSC humanas isoladas da medula óssea (Figura 7B) e no co-cultivo das células HUT-102 (HTLV-1⁺) com HBMS, que resultou na redução de 1,87 vezes na expressão de p19 quando comparada com as células MT-2 que foram cultivadas na ausência de MSC (Figura 7C).

Figura 7. Detecção do antígeno p19 do HTLV-1 por ELISA. Quantificação por ELISA do antígeno p19 presente no sobrenadante de cultura após 3, 24, 48 e 72 horas. (A) Ensaio de co-cultivo realizados em duplicata (médias $\pm$ SEM) utilizando as células MT-2 e HBMS; (B) Ensaios de co-cultivo utilizando as células MT-2 e células mesenquimais estromais da medula óssea (MSC) e (C) Ensaio de co-cultivo utilizando as células HUT-102 e HBMS. As barras em branco representam as células HTLV-1⁺ cultivadas sozinhas e as barras escuras representam as células HTLV-1⁺ co-cultivadas com HBMS ou MSC.

Como o efeito imunomodulatório das MSC envolve a liberação de fatores solúveis como citocinas e fatores de crescimento, em seguida nós avaliamos a expressão de IL-6 em diferentes linhagens infectadas pelo HTLV-1 (MT-2 e HUT-102), que foram cultivadas na presença ou ausência de HBMS ou MSC por diferentes períodos de tempo. Conforme a Figura 8, as células MT-2 e HUT-102 expressaram níveis muito baixos de IL-6 nos períodos de 3 e 24 horas, e mesmo com 48 horas de cultivo o nível de expressão de IL-6 foi baixo. As MSC e HBMS secretaram 8 vezes mais quantidades de IL-6 quando comparadas com as células HTLV-1⁺ e esta secreção foi homogênea nos períodos de 3, 24 e 48 h (Figura 8). Porém, quando estas duas populações celulares (HTLV-1⁺ e MSC) foram co-cultivadas, observamos um aumento de 1,7 vezes na secreção de IL-6 quando comparada com as MSC sozinhas (Figura 8).

Figura 8. Expressão de interleucina 6 (IL-6). Quantificação por ELISA da secreção de IL-6 no sobrenadante de diferentes tipos celulares por um período de 3, 24 e 48 horas. (A) Ensaio de co-cultivo utilizando as células MT-2 e HBMS; (B) Ensaio de co-cultivo utilizando as células MT-2 e células mesenquimais estromais da medula óssea (MSC); (C) Ensaio de co-cultivo utilizando células HUT-102 e HBMS. As barras hachuradas representam as células HTLV-1⁺ cultivadas sozinhas; as barras em branco representam as células HBMS ou MSC cultivadas sozinhas e as barras em preto representam as células HTLV-1⁺ co-cultivadas com HBMS ou MSC.

Além da liberação de fatores solúveis, os mecanismos imunomodulatórios pelas MSC envolvem a expressão de moléculas como indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), prostaglandina E2 (PGE2), galectina 1 (LGALS1) e VCAM-1. Desta forma, analisamos a expressão destes genes em amostras de MSC cultivadas na ausência ou na presença de células MT-2. De acordo com a Figura 9, as moléculas imunoregulatórias IDO, PGE2 e VCAM-1 são significativamente mais expressas ($p \leq 0,05$) nas MSC que foram co-cultivadas com células MT-2, indicando que os mecanismos de supressão das células T usados pela MSC também podem ocorrer na infecção pelo HTLV-1.

Figura 9. Expressão do mRNA de genes relacionados com a imunorregulação pelas MSC. Quantificação por PCR em tempo real da expressão dos genes indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), prostaglandina E2 (PGE2), galectina 1 (LGALS1) e VCAM-1 em células mesenquimais estromais da medula óssea (MSC) cultivadas sozinhas (barras brancas) e co-cultivadas com MT-2 (barras cinzas). Os dados são apresentados como unidade relativa de expressão (URE) e representam as médias $\pm$ SEM de ensaios em triplicata. Para análise estatística foi utilizado o *Mann-Whitney test*, e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação a MSC cultivada na ausência de células MT-2 (* $p \leq 0,05$).

1.3 Potencial de imunorregulação das MSC sobre PBMC isoladas de indivíduos controles e de indivíduos com HTLV-1

Os resultados obtidos no co-cultivo das linhagens celulares MT-2 e HUT-102 sugerem que a diminuição da expressão dos genes e proteínas virais do HTLV-1 pode estar relacionada com o efeito imunomodulatório que as MSC exercem na proliferação de linfócitos T alogênicos. Desta forma, investigamos se existem diferenças na modulação da linfoproliferação por MSC entre linfócitos T provenientes de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e indivíduos não infectados. Para esse experimento, PBMC foram isoladas, marcadas com CFSE, estimuladas ou não com fitohemaglutinina (PHA) e cultivadas na presença ou na ausência de MSC. Inicialmente, foram testadas cinco proporções celulares (1:5, 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100) (MSC/PBMC), com o objetivo de determinar a melhor proporção celular para os ensaios de co-cultivo com as células T isoladas de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Após cinco dias de co-cultivo, a análise por citometria de fluxo da porcentagem de proliferação das PBMC estimuladas com PHA foi de $90,02 \pm 4,5\%$, no entanto, as médias das porcentagens de proliferação de PBMC cultivadas na presença de números crescentes de MSC foram: proporção 1:5 = $21,8 \pm 15$; 1:10 = $35,7 \pm 7,6$; 1:20 = $80,9 \pm 6,2$; 1:50 = $84,3 \pm 6,5$ e 1:100 = $86,3 \pm 6,1$ (Figura 10). Observamos que as MSC possuem a capacidade de diminuir a proliferação de linfócitos T alogênicos de forma significativa (50 e

80%) ($p \leq 0,05$) em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e em indivíduos não-infectados nas proporções de 1:5 e 1:10 (MSC/linfócitos). Em proporções maiores (1:20, 1:50 e 1:100) não foram observadas diferenças significativas na proliferação dos linfócitos $CD3^+$ (Figura 10).

Figura 10. Análise da proliferação de células T utilizando diferentes proporções de células. A) Proliferação de células $CD3^+$ pela detecção de CFSE por citometria de fluxo; (I) Células mononucleares obtidas a partir de sangue periférico (PBMC) marcadas com CFSE e cultivadas na ausência de fitohemaglutinina (PHA); (II) PBMC marcadas com CFSE e cultivadas na presença de PHA; (III) PBMC marcadas com CFSE e cultivadas na presença de PHA e de células mesenquimais estromais da medula óssea (MSC) na proporção de 1:5 (MSC/PBMC); (IV) PBMC marcadas com CFSE e cultivadas na presença de PHA e de MSC na proporção de 1:20 (MSC/PBMC). A quantidade de CFSE diminui devido à divisão celular e a detecção da emissão de fluorescência do CFSE corresponde à porcentagem de proliferação das células T; (B) Ensaio de co-cultivo com diferentes proporções celulares. As barras em branco representam o indivíduo controle e as barras em cinza o indivíduo HTLV-1⁺. Os resultados foram feitos com uma amostra biológica em triplicata. Os asteriscos representam $p \leq 0,05$ aplicando *Mann-Whitney test* e comparando os ensaios de co-cultivo (1:5) e (1:10) com as PBMC estimulada com PHA e cultivadas na ausência de MSC.

A proporção celular ótima para os ensaios de co-cultivo foi determinada em 1:5 (maior taxa de inibição da linfoproliferação pelas MSC) e 1:20 (não há influência das MSC na linfoproliferação). Assim, o próximo passo foi investigar se as MSC podem modular a proliferação de linfócitos T provenientes de indivíduos infectados pelo HTLV-1 de maneira similar ao que ocorre em condições normais. Para tal, foram utilizados amostras de PBMC de 18 indivíduos infectados pelo HTLV-1 (8 assintomáticos e 10 HAM/TSP) e de 5 indivíduos não infectados. Todos os indivíduos incluídos neste ensaio apresentaram valores $CD4/CD8$ dentro dos padrões normais (Apêndice 2).

De acordo com a Figura 11, a MSC inibiu significativamente ($p<0,05$) a proliferação dos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ isolados de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e de indivíduos controles nas proporções de 1:5 e 1:20 (MSC/linfócitos). No entanto, quando comparamos a percentagem de inibição da proliferação entre os três grupos de amostras (linfócitos obtidos de indivíduos HTLV-1⁺ assintomáticos, indivíduos com HAM/TSP e indivíduos controles), nenhuma diferença significativa foi encontrada.

Figura 11. Análise da proliferação de linfócitos T em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e em indivíduos controles. Proliferação de linfócitos T $CD4^+$ (A) e $CD8^+$ (B) pela detecção de CFSE por citometria de fluxo. As barras em branco representam as células mononucleares obtidas a partir de sangue periférico (PBMC) marcadas com CFSE e cultivadas na presença de fitohemaglutinina (PHA); as barras em cinzas representam as PBMC marcadas com CFSE e cultivadas na presença de PHA e células mesenquimais estromais da medula óssea (MSC) na proporção de 1:5 (MSC/PBMC); as barras em preto representam as PBMC marcadas com CFSE e cultivadas na presença de PHA e MSC na proporção de 1:20 (MSC/PBMC). Os dados são apresentados como médias $\pm$ SEM de ensaios em triplicata. CT = indivíduos controle (n=05); HAC = indivíduos HTLV-1⁺ assintomáticos (n=08); HAM = indivíduos HTLV-1⁺ com HAM/TSP (n=10). Os asteriscos representam $p\leq 0,05$ aplicando *Mann-Whitney test* e comparando os ensaios de co-cultivo (1:5) e (1:20) com as PBMC cultivadas na ausência MSC.

Para determinar se a habilidade das MSC em suprimir a proliferação das células T HTLV-1⁺ pode ser mediada pela liberação de fatores solúveis, a expressão de indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), prostaglandina E2 (PGE2), galectina 1 (LGALS1) e VCAM-1 foi avaliada em MSC co-cultivadas na presença ou ausência de PBMC obtidas de indivíduos controles e indivíduos infectados com HTLV-1. De acordo com a Figura 12, as moléculas imunoregulatórias PGE₂ e IDO foram significativamente mais expressas ($p\leq 0,05$) nas MSC co-cultivadas com PBMC, indicando que os mecanismos de supressão das células T usados pela MSC também ocorrem na infecção pelo HTLV-1. No entanto, não foram observadas diferenças significantes na expressão de IDO e PGE₂ entre as MSC co-cultivadas com PBMC obtidas de indivíduos controles ou de indivíduos HTLV-1⁺ (Figura 12 A e B). A expressão das

moléculas LGALS1, VCAM-1 e IL-6 foi semelhantes nas MSC cultivadas sozinhas e co-cultivadas com PBMC (Figura 12 C, D e E).

Figura 12. Expressão do mRNA de genes relacionados com a imunorregulação pelas MSC. Quantificação por PCR em tempo real da expressão dos genes indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), prostaglandina E2 (PGE2), Galectina 1 (LGALS1), VCAM-1 e interleucina 6 (IL-6), em PBMC obtidas de indivíduos HTLV-1⁺ e indivíduos controles. As barras hachuradas representam as células mesenquimais estromais da medula óssea (MSC); as barras em branco representam as PBMC de indivíduos controle (CT); as barras em cinza representam as PBMC de portadores assintomáticos do HTLV-1 (HAC) e as barras em preto representam as PBMC de indivíduos com mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espática tropical (HAM/TSP). O sinal (-) indica PBMC cultivada na ausência de MSC e o sinal (+) indica PBMC co-cultivadas com MSC. Os dados são apresentados como unidade relativa de expressão (URE) e representam as médias $\pm$ SEM (n= 7). Utilizou-se o *Mann-Whitney test*, e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação a MSC cultivada na ausência de PBMC (* p < 0,05, ** p < 0,01).

Os resultados descritos acima sugerem que as MSC podem atuar no controle da linfoproliferação de forma similar em indivíduos controles e em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Entretanto, na infecção pelo HTLV-1 uma pequena parcela (< 5%) das PBMC circulantes é infectada por este vírus. Desta forma, para investigar o papel das MSC em células HTLV-1⁺, nós avaliamos a expressão do gene *pol* do HTLV-1 em amostras de linfócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 que foram submetidos ou não ao co-cultivo com MSC.

A quantificação do gene *pol* por PCR em tempo real mostrou que as amostras de PBMC HTLV-1⁺ que foram co-cultivadas com as MSC apresentaram uma expressão 7,3 vezes menor do mRNA do gene *pol* do HTLV-1 (p=0,0128), quando comparadas com as

PBMC cultivadas na ausência de células MSC (Figura 13A). Esta diminuição significativa também foi observada entre as amostras de indivíduos HTLV-1⁺ HAM/TSP co-cultivadas com MSC ($p=0,0325$). Entre as amostras de indivíduos assintomáticos e indivíduos HAM/TSP não foram observadas diferenças significativas (Figura 13 B).

Figura 13. Expressão de gene *pol* do HTLV-1. Quantificação por PCR em tempo real dos níveis de mRNA do gene *pol* em amostras de PBMC cultivadas na presença ou ausência de células mesenquimais estromais da medula óssea (MSC). Os dados são apresentados usando unidades relativas de expressão (URE) e os resultados estão representados como a média $\pm$ SEM ($n=7$). HAC= portador assintomático do HTLV-1; HAM/TSP= indivíduo com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1. Os asteriscos denotam diferenças significativas ($*p < 0,05$) em relação à PBMC cultivada na ausência de MSC utilizando *Mann-Whitney test*.

Em seguida, foi avaliado se o efeito de inibição observado na expressão do gene *pol* também pode ser notado na secreção da proteína p19 do HTLV-1. Para este experimento, foram coletados os sobrenadantes das PBMC provenientes de indivíduos HTLV-1⁺ assintomáticos e HAM/TSP que foram submetidas ou não ao co-cultivo com MSC. Os resultados mostraram que a expressão da proteína p19 foi 1,8 vezes menor nas PBMC co-cultivadas com MSC (Figura 14).

Figura 14. Detecção do antígeno p19 do HTLV-1 por ELISA em PBMC co-cultivadas com MSC. Quantificação por ELISA do antígeno p19 presente no sobrenadante de cultura de PBMC obtidas de indivíduos com HTLV-1 que foram cultivadas na presença ou ausência de células mesenquimais estromais da medula óssea (MSC). HAC= portador assintomático do HTLV-1; HAM/TSP= indivíduo com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1. Os dados estão representados como a média $\pm$ SEM.

1.4 Avaliação de subpopulações linfocitárias após o ensaio de co-cultivo de PBMC com MSC

A capacidade das MSC em induzir subpopulações de células reguladoras foi investigada através de experimentos de imunorregulação. Esses experimentos consistiram em avaliar o fenótipo e a frequência das subpopulações linfocitárias (HLA⁺CD4⁺CD3⁺, HLA⁺CD8⁺CD3⁺, CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺) recuperadas após o co-cultivo de MSC isoladas de indivíduos controles com PBMC obtidas de indivíduos com HTLV-1. Não foram encontradas diferenças significantes na frequência de células T (HLA⁺CD4⁺CD3⁺, HLA⁺CD8⁺CD3⁺, CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺) após o co-cultivo com MSC. Além disso, as subpopulações linfocitárias obtidas após o co-cultivo foi similar nas amostras de PBMC de isoladas de indivíduos controles e indivíduos com HTLV-1 (HAM/TSP ou HAC) (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de subpopulações celulares antes e após o ensaio de co-cultivo de PBMC com MSC

Populações celulares	CT	CT+MSC	HAC	HAC+MSC	HAM/TSP	HAM/TSP+MSC
HLA ⁺ CD4 ⁺ CD3 ⁺	7,3±5,6	12,8±11,5	8,9±5,3	7,8±5,5	10,6±8,8	6,1±7,1
HLA ⁺ CD8 ⁺ CD3 ⁺	8,0±4,7	13,3±14,6	9,3±5,8	5,8±1,9	5,8±3,0	4,4±4,6
CD4 ⁺ CD25 ^{high} FoxP3 ⁺	18,4±25,9	6,1±5,0	20,6±20,2	12,2±10,6	15,8±14,2	10,5±8,4
CD4 ⁺ /Tax ⁺	-	-	1,1±1,3	1,6±2,0	2,4±3,1	1,4±1,2

CT= indivíduo controle; HAC= portador assintomático do HTLV-1; HAM/TSP= indivíduo com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1.

2. Análise *in vitro* do efeito da exposição do HTLV-1 em MSC

De acordo com a literatura, as MSC que são previamente desafiadas com proteínas virais podem se comportarem de maneira diferenciada, exibindo um maior potencial imunomodulador. Entretanto, no presente trabalho não foi observada uma maior eficiência da imunorregulação quando utilizados linfócitos obtidos de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Considerando que o HTLV-1 em contato com a MSC possa causar modificações nestas células que comprometam o desempenho das funções das MSC foi avaliado se a exposição ao HTLV - 1 poderia modificar as propriedades das MSC.

Uma análise morfológica e ultraestrutural foi realizada para identificar as possíveis alterações induzidas pelo HTLV-1 em MSC. Para este propósito, foram testadas três condições de cultura distintas: 1) MSC na presença de 100 ng de partículas virais livre de células; 2) MSC co- cultivadas com células MT-2 sem o contato direto (utilizando o sistema *Transwell* que consiste de uma membrana que permite a interação de substâncias solúveis

entre as células) e 3) MSC co- cultivadas com células MT-2 submetidas a irradiação (60.000 Gy). Para a cultura controle, as MSC foram cultivadas no mesmo meio, na ausência de vírus. De acordo com a análise por microscopia de luz a morfologia das MSC não foi alterada pela exposição ao HTLV-1. As células mantiveram a sua morfologia fusiforme fibroblastóide semelhante às MSC controle (Figuras 15 A e B). No entanto, a análise ultraestrutural de MSC cultivadas na presença do HTLV-1 mostraram alterações morfológicas em comparação com a MSC controle, incluindo um aumento no número de vesículas intracelulares (Figuras 15 C e D). Além disso, observou-se a libertação de partículas virais de HTLV-1 por células MT-2 (Figura 15 E) co-cultivados em alta proximidade com as MSC (Figura 15 F).

Figura 15. Caracterização das MSC expostas ao HTLV-1. A e B) Análise morfológica por microscopia de luz de células mesenquimais estromais de medula óssea (MO) controle (MSC) (A) e MSC expostas ao HTLV-1 (B). As barras de escala representam 100 mM. C-F) Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão de MSC controle (C) e MSC expostas ao HTLV (D) com inúmeras vesículas intracelulares (indicadas pelas setas); (E) partículas de HTLV-1 a partir de células MT-2 são observados no espaço extracelular (setas); (F) as partículas de vírus HTLV-1 são encontrados em estreita associação com as MSC (setas). Escala da barra = 1 μm.

A seguir, para investigar o efeito do HTLV-1 sobre as características fisiológicas das MSC, foi analisado o nível de expressão de moléculas da superfície das MSC por citometria de fluxo. A análise revelou que a expressão de moléculas de adesão, tais como a VCAM-1 (CD106) e ICAM-1 (CD54), foram aumentadas significativamente em MSC expostas ao HTLV-1 ($p < 0,01$) em comparação com o grupo controle. O aumento nos níveis de expressão de CD54 e CD106 foi semelhantes em MSC cultivadas com células HTLV-1⁺ irradiadas e

MSC cultivadas com HTLV-1 sem a presença de células (Figuras 16A e B). Também foi observado que a expressão de aminopeptidase N (CD13) foi 1,3 vezes menor em MSC cultivadas com células MT-2 irradiadas ($p = 0,007$; Figura 16C). A expressão do receptor de superfície celular MHC de classe II (HLA-DR) (MHC *class II cell surface receptor*) foi 7,7 vezes superior nesta mesma população de células ($p = 0,0006$). É importante ressaltar que foi observada somente uma diferença entre as MSC que entraram em contato direto com células infectadas pelo HTLV-1 e MSC cultivadas na ausência de infecção por HTLV-1 (Figuras 16C e D). Diferenças significativas também foram observadas na expressão do receptor de NGF p75NTR (CD271) que foi 2,5 vezes menor em MSC cultivadas com vírus concentrado ($p = 0,0247$) em comparação com culturas de MSC controle (Figura 16E). Os níveis de expressão de HLA-ABC, CD73, endogлина (CD105) e CD45 foram semelhantes ($p > 0,05$) em culturas de MSC controle e MSC expostas ao HTLV-1 (Apêndice 3, A, B, C e D).

Figura 16. Efeito do HTLV-1 na expressão de moléculas de superfície das MSC. As MSC foram cultivadas por 18 horas sob diferentes condições de cultivo: células mesenquimais estromais da medula óssea (MO) controle, MSC cultivadas com células MT-2, utilizando um sistema *transwell* (MSC + trans), MSC cultivadas com partículas de HTLV-1 livre de células (MSC + vírus) e as MSC cultivadas na presença de células MT-2 irradiadas (MSC + MT-2). Os dados são apresentados como médias $\pm$ SEM de percentagem das células marcadas com (A) anti-CD106; (B) anti-CD54; (C) anti-CD13; (D) anti-HLA-DR; (E) anti-CD271 e avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados foram obtidos a partir de pelo menos três experimentos independentes e avaliados utilizando o *Mann-Whitney test*. Os asteriscos denotam diferenças significativas em comparação com a cultura de MSC controle (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, e *** $p < 0,001$).

As variações observadas na expressão das moléculas de superfície CD106, CD54 e CD271 também foram avaliadas por qPCR. A cultura de MSC com células MT-2 utilizando o sistema *transwell* resultou em um aumento de 5,3 a 2,3 vezes nos níveis de expressão de

mRNA de CD106 e CD54 sobre as MSC (Apêndice 3 E e F). Entretanto, o aumento significativo foi obtido quando as MSC foram cultivadas na presença partículas virais ou por meio do contato direto de células infectadas (6,8 a 18 vezes). Ainda, foi observado que a expressão do gene CD271 foi menor (4,5 vezes) em MSC cultivadas na presença de HTLV-1 quando comparadas com MSC cultivadas na ausência do HTLV-1 (Apêndice 3 G). O próximo objetivo foi investigar se as características imunofenotípicas das MSC também poderiam ser alteradas pelo co-cultivo com PBMC isoladas de indivíduos HTLV-1. Dessa forma, amostras de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (assintomáticos e sintomáticos) foram coletadas e avaliadas quanto a expressão de moléculas de adesão (CD106 e CD54), HLA -DR, e CD271 em MSC. Todos os indivíduos incluídos neste ensaio exibiram uma proporção de células T CD4⁺/CD8⁺, dentro dos limites normais (Apêndice 4). Como mostrado na Figura 17, CD106 foi mais expresso (10 vezes) nos MSC cultivadas com PBMC do grupo sintomático de HTLV-1, quando comparadas com as MSC cultivadas com células obtidas a partir de indivíduos controles ou de indivíduos assintomáticos infectados ($p = 0,0189$; Figura 17A). A expressão de HLA-DR foi 2,6 vezes mais elevada em MSC cultivadas com PBMC isoladas de indivíduos HTLV-1 sintomáticos quando comparadas com MSC cultivadas com células de indivíduos controles ou de indivíduos assintomáticos infectados ($p=0,0175$; Figura 17B). Os níveis de expressão de CD54 e CD271 não mostraram diferenças entre MSC cultivadas com PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e indivíduos controles (Apêndice 3, H e I).

Figura 17. Perfil imunofenotípico das MSC co-cultivadas com PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1. As MSC foram cultivadas com PBMC isoladas de indivíduos sintomáticos infectados pelo HTLV-1 (mielopatia associada ao HTLV-1)/paraparesia espática tropical (HAM/TSP), portadores assintomáticos do HTLV-1 (HAC) e indivíduos controles (controle) utilizando um sistema *transwell*. Os dados são apresentados como médias $\pm$ SEM da porcentagem de células marcadas com os anticorpos (A) anti-CD106 e (B) anti-HLA-DR e avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. Foi utilizando *Mann-Whitney test*. * $p < 0,05$ em comparação com indivíduos controle.

Com o objetivo de avaliar se a exposição ao HTLV-1 pode alterar o potencial de diferenciação das MSC, foi realizado o cultivo das MSC com partículas virais (utilizando um sistema *transwell* ou HTLV-1 concentrado livre de células) ou co-cultivamos as MSC diretamente com células MT-2 irradiadas durante um período de 18 horas. Após esse período, as MSC foram diferenciadas em adipócitos e osteócitos por 22 dias, utilizando o meio apropriado de indução da cultura. Em resposta a diferenciação adipogênica, observou-se alterações na morfologia celular e a formação de vacúolos lipídicos, como visualizado através da coloração Sudan II/Escarlate, independentemente da presença ou ausência de HTLV-1 (Figuras 18 C, E, G, e I). A análise da expressão do gene *Peroxisome proliferator-activated receptor- gamma* (PPAR- γ) mostrou um aumento de 70 vezes em MSC submetidos à diferenciação adipogênica em comparação com MSC não induzidas. No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada quando comparado a expressão do mRNA do gene PPAR- γ em MSC cultivadas na presença de HTLV-1 e a cultura de MSC controle (Figura 18 ii).

O efeito do HTLV-1 na osteogênese foi avaliado comparando o potencial de diferenciação das culturas de MSC controle com MSC expostas ao HTLV-1. Foi observado que a capacidade de diferenciação em osteócitos das MSC não foi alterada pelo HTLV-1 e as análises de deposição de cálcio e a mineralização da matriz extracelular indicaram que não houve diferenças significativas no potencial de diferenciação osteogênica das amostras estudadas (Figuras 18 D, F, H e J). A análise da expressão de mRNA do gene *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) revelou que este gene estava 2,4 vezes mais expresso em MSC que sofreram diferenciação em osteócitos que em MSC não diferenciadas. Entretanto, o nível de expressão de RUNX2 em MSC que estiveram em contato com o HTLV-1 foi semelhante ao encontrado na cultura de MSC controle, indicando que o HTLV-1 não altera o potencial de diferenciação das MSC em osteócitos (Figura 18 III). Portanto, estes resultados sugerem que o HTLV-1 não altera o potencial de diferenciação das MSC em adipócitos e osteócitos.

Figura 18. Diferenciação adipogênica e osteogênica das MSC expostas ao HTLV-1. I) Análise morfológica das células mesenquimais estromais de medula óssea (MSC) cultivadas durante 18 horas na presença ou ausência de infecção por HTLV-1. As MSC foram coradas pelo Sudan II-escarlate (C, E, G e I) e pelo método de *von Kossa* (D, F, H e J) para avaliar o potencial de diferenciação adipogênica e osteogênica, respectivamente. (A, B) MSC controle cultivadas em meio de cultura padrão; (C,D), MSC controle; (E, F) MSC cultivadas com células MT-2, utilizando um sistema *transwell*; (G, H) MSC cultivadas com partículas de HTLV-1 livres de células; (I, J) MSC cultivadas na presença de células MT-2 irradiadas. As setas indicam vacúolos lipídicos (C, E, G e I) e nódulos de mineralização (D, F, H e J). As barras de escala representam 20 mM. II) Expressão do gene PPAR- γ em MSC durante a diferenciação adipogênica, determinada por qRT-PCR. III) Nível de expressão do gene RUNX2 durante a diferenciação em osteoblastos, determinada por qRT-PCR. As células estromais mesenquimais controle (MSC), MSC cultivadas com células MT-2 em um sistema *transwell* (MSC + trans), MSC cultivadas com partículas de HTLV-1 livre de células (MSC + vírus) e as MSC cultivadas na presença de células MT-2 irradiadas (MSC + MT-2). ADI: indução adipogênica; WD: sem indução de diferenciação; OSTEO: indução osteogênica. Os dados são apresentados usando unidades relativas de expressão (URE) e os resultados estão representados como a média $\pm$ SEM (n = 4 por grupo). Os asteriscos denotam diferenças significativas utilizando *Mann-Whitney test* em relação a MSC controle não diferenciada (* $p \leq 0,05$).

Considerando que o HTLV-1 infecta vários tipos celulares foi questionado se as MSC são suscetíveis à infecção pelo HTLV-1 *in vitro*. Primeiramente, foi avaliada a expressão dos genes que codificam proteínas conhecidas como receptores para o HTLV-1, tais como

GLUT1, HSPG e NRP1. Os produtos destes genes estão envolvidos na interação inicial entre a célula-vírus e são necessárias para a infecção pelo HTLV-1 em diferentes tipos de células. As MSC isoladas da MO de indivíduos controles apresentaram um nível de expressão do gene GLUT1 semelhante ao obtido em células T CD4⁺ isoladas de indivíduos controles e de indivíduos infectados pelo HTLV-1. O gene HSPG foi mais expresso (37 vezes) em MSC comparado com as células T CD4⁺ de indivíduos HTLV-1 ($p = 0,0022$). O nível de expressão do gene NRP1 foi 11 vezes maior em células T CD4⁺ de indivíduos HTLV-1⁺ comparado com as células T CD4⁺ de indivíduos controles ($p = 0,004$), no entanto, o maior nível de expressão do NRP-1 foi detectado em MSC (Figura 19). Todas as amplificações foram específicas para os genes acima descritos, evidenciado pela curva de *melting* (Apêndice 5).

Figura 19. Expressão de genes considerados receptores para o HTLV-1 em diferentes tipos celulares. Quantificação por PCR em tempo real dos níveis de mRNA de GLUT1(*solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1*), HSPG (*heparan sulfate proteoglycan 2*) e NRP-1(*neuropilin 1*) em células T CD4⁺ isoladas a partir de indivíduos controles e de indivíduos infectados com HTLV-1 e MSC. Os dados são apresentados como unidade relativa de expressão (URE) e representam as médias $\pm$ SEM de ensaios em triplicata. Utilizou-se *Mann-Whitney test*, e os asteriscos denotam diferenças significativas em comparação com as células T CD4⁺ (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$).

Para avaliar se o contato de HTLV-1 com MSC permite a infecção de MSC, foi investigada a presença do provírus em amostras de DNA extraídas de MSC expostas ao HTLV-1. Observou-se a amplificação do gene *Tax* do HTLV-1 por PCR apenas em MSC que foram cultivadas com células MT-2 irradiadas. Nenhuma amplificação foi observada em MSC cultivadas com partículas de HTLV-1 livres de células e nas culturas de MSC controle (Figura 20I). A seguir, foi realizada uma análise por microscopia confocal utilizando os anticorpos anti p19 e anti CD73 para verificar a expressão da proteína p19 do HTLV-1 em MSC. A molécula de superfície CD73 (ecto-5'-nucleotidase) é um marcador característico de MSC e

não é expresso na linhagem MT-2 (dados não mostrados). Portanto com a utilização deste marcador foi possível visualizar apenas as MSC. Como mostrado na Figura 20II (E e F), as MSC cultivadas com células MT-2 foram positivas para a proteína p19 do HTLV-1 e esses resultados corroboraram com as análises obtidas por PCR (Figuras 20IIE e 20IIF). Não foi observada nenhuma evidência de sinal específico para p19 nas culturas de MSC controle (Figuras 20IIH e 20III). A proteína reguladora TAX do HTLV- 1 também foi detectada em MSC co-cultivadas com células MT-2 por citometria de fluxo, sugerindo que o HTLV-1 é capaz de produzir uma infecção produtiva com replicação viral em MSC (Figura 20, IV).

Figura 20. Infecção *in vitro* por HTLV-1 em MSC. I) Amplificação por PCR do gene β -globina e HTLV-1. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. As células mesenquimais estromais controle (MSC01, MSC02, e MSC03), MSC cultivadas com partículas de HTLV-1 livre de células (MSC01 + vírus, MSC02 + vírus, e MSC03 + vírus) e as MSC cultivadas na presença de células irradiadas (MT-2 MSC01 + MT-2, MSC01 + MT-2 e MSC01 + MT-2), MT-2 DNA (controle positivo) e o controle negativo (NTC). II) Imunofluorescência das células estromais mesenquimais. (A) MSC co-cultivadas com células MT-2 foram coradas com DAPI (azul) e (B) anti-CD73 (vermelho); (C) sobreposição de DAPI (azul) e anti- CD73 (vermelho). MSC co-cultivados com células MT-2 foram marcadas com (D) DAPI (azul) e (E) anti- CD19 (verde); (F) sobreposição de DAPI (azul) e anti- CD19 (verde). O núcleo de MSC controle foram marcadas com (G) DAPI (azul) e (H) anti-CD19 (verde); (I) sobreposição de DAPI (azul) e anti- CD19 (verde). As barras de escala representam 10 μ m. III e IV) Representação da análise dot plott por citometria de fluxo das MSC co-cultivadas com células MT-2. (III) Anticorpos isotipo controle. (IV) Os pontos no quadrante superior direito representam células que co-expressam CD73 e a proteína TAX do HTLV-1 (8%).

3. Análise da Medula óssea de indivíduos HTLV-1⁺

3.1 Linfócitos T CD4⁺

O próximo passo consistiu em avaliar se linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1 podem circular na medula óssea de portadores assintomáticos com HTLV-1 e indivíduos com HAM/TSP. Para este experimento, foram isoladas por punção de MO amostras de três grupos de indivíduos: três portadores assintomáticos do HTLV-1 (HAC), três indivíduos com HAM/TSP e três indivíduos controles não infectados pelo HTLV-1. Em Apêndice 6 estão listadas as características clínicas das amostras dos indivíduos com HTLV-1 e dos indivíduos

controles. De acordo com a Figura 21, foi observado um infiltrado de linfócitos T CD4⁺ na MO de indivíduos HTLV-1⁺ quando comparado com o grupo de indivíduos não infectados ($p < 0,05$).

Figura 21. Análise das células mononucleares da medula óssea (BM-MNC) de indivíduos controles e indivíduos infectados pelo HTLV-1. As BM-MNC foram isoladas de portadores assintomáticos infectados pelo HTLV-1 (HAC), indivíduos sintomáticos (mielopatia associada ao HTLV-1)/paraparesia espática tropical (HAM/TSP) e indivíduos controles (CT). Os dados são apresentados como médias $\pm$ SEM da porcentagem de células marcadas com os anticorpos anti-CD3 e anti-CD4 e avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. Foi utilizado *Mann-Whitney test*. * $p < 0,05$ em comparação com indivíduos HAM/TSP.

Após a caracterização das células da MO por citometria de fluxo, foram reservados 2 mL da MO para avaliação da presença do HTLV-1 na MO e 2 mL para isolamento de MSC.

A detecção da infecção por HTLV-1 em células T CD4⁺ isoladas da MO de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foi avaliada pela expressão da proteína viral TAX por citometria de fluxo. De acordo com as análises da Figura 22, a proteína TAX do HTLV-1 foi detectada em linfócitos T CD4⁺ da MO de todos os indivíduos infectados pelo HTLV-1, independentemente do estado clínico, HAC ou HAM/TSP (Figura 22 A III - VIII).

Os resultados de infecção pelo HTLV-1 em linfócitos T CD4⁺ da MO obtidos por citometria de fluxo também foram confirmados por amplificação por PCR do genes *tax* e *LTR* do HTLV-1. Entretanto, antes de proceder com o PCR, foi necessário certificar que a população de células T CD4⁺ isoladas da MO possuía alto nível de pureza. Assim, foi observado que após a separação de células utilizando *beads* magnéticas o nível médio de pureza foi de 80%, mas uma alta pureza da população de células T CD4⁺/CD3⁺ (98,7% para indivíduos HAC e 98,2 % para HAM/TSP) foi obtida após a purificação celular por *sorting* utilizando citometria de fluxo (Figura 22B). Após obter uma população de células T CD4⁺ isoladas da MO com pureza maior que 95%, foi avaliado o conteúdo viral integrado nestas células realizando uma *nested-PCR* para os genes *tax* e *LTR* do HTLV-1. De acordo com a Figura 22C, foi possível visualizar a amplificação dos fragmentos referente ao gene *tax* (444

bp) e *LTR* (253 bp) do HTLV-1 nas células T CD4⁺ da MO de indivíduos assintomáticos e HAM/TSP. Nenhuma das células T CD4⁺ de indivíduos controles mostraram amplificação de DNA para HTLV-1. Também foi observado alta carga proviral nas células T CD4⁺ da MO de indivíduos assintomáticos (HAC25) (37.558,81 cópias virais/10⁵ células) e HAM/TSP (HAM 28) (26.832,19 cópias virais/10⁵ células).

Figura 22. Detecção do HTLV-1 em células T CD4⁺ da MO. A) Análise por citometria de fluxo da expressão da proteína TAX do HTLV-1 em indivíduos infectados assintomáticos (HAC) (I-IV) e indivíduos com HAM / TSP (V-VIII). (I e V) Figura ilustrativa com gráficos de pontos que representa a complexidade e granularidade interna das células mononucleares da MO (BMMC). (II e VI) os pontos no quadrante superior direito do gráfico representam a seleção de células marcadas com anti-CD4-PerCP (*peridinin chlorophyll protein complex*) e anti-CD3-APC (*allophycocyanin*); (III, IV, VII e VIII) Histogramas representando a percentagem de células T CD4⁺/CD3⁺ expressando a proteína TAX do HTLV-1 (2,6 - 7,8%). B) Análise por citometria de fluxo após o *sorting* celular indicando a pureza das células T CD4⁺ isoladas da MO de (B I) indivíduos HTLV-1⁺ assintomáticos e (B II) indivíduos com HAM/TSP. Nenhum sinal específico foi evidenciado no isotipo controle. C) Amplificação por *nested*-PCR (I) do gene *Tax* (444 pb) e *LTR* (253 pb); (II) o gene da β -globina humano (659 pb) foi utilizado como controle interno da reação de PCR. Estes procedimentos foram realizados apenas uma vez.

3.2 Análise das MSC

As células mononucleares da MO foram semeadas em garrafas de cultura celular com o objetivo de isolar MSC por aderência ao plástico. Após 7-15 dias, o meio de cultura foi removido juntamente com as células não aderentes e foi possível observar a formação de

unidades formadoras de colônia fibroblastóide (CFU-F) aderidas ao plástico da garrafa de cultura. É importante ressaltar, que para as amostras de indivíduos com HAM/TSP a observação das CFU-F ocorreu apenas após 15 ou 25 dias de cultura. De acordo com a análise por microscopia de luz a morfologia fusiforme fibroblastóide das MSC isoladas de indivíduos HTLV-1 (HAC e HAM/TSP) (Figura 23 E, F, G e H) foi semelhante à morfologia das MSC isoladas de indivíduos controles (Figura 23 C e D). Contudo, as amostras de MSC de indivíduos HTLV-1 com HAM/TSP formaram colônias com tamanho menor, quando comparada com às colônias obtidas com as MSC dos indivíduos HTLV-1 assintomáticos (Figura 23 E e G). Além disso, observou-se que o número de CFU-F foi significativamente menor em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (CFU-F/ 5×10^5 células em HAM/TSP ($2,1 \pm 1,6$), HAC ($7,5 \pm 2,1$) quando comparado com o grupo indivíduos não infectados ($10,4 \pm 1,1$) (Figuras 23 A e B).

Figura 23. Caracterização morfológica de MSC isoladas de indivíduos controles e indivíduos com HTLV-1. (A e B) Número de progenitores mesenquimais (CFU-F) em (A) $2,5 \times 10^5$ e (B) $5,0 \times 10^5$ células mononucleares da MO; (C e D) Análise morfológica por microscopia de luz de células mesenquimais estromais de medula óssea (MO) controle (MSC); (E-F) MCS obtida de um indivíduo HTLV-1⁺ assintomático (HAC), (E) Formação de colônia de MSC após 15 dias de cultivo e (F) Cultura de MSC na 2^a passagem; (G-H) MCS obtida de um indivíduo HTLV-1⁺ com HAM/TSP (G), Formação de colônia de MSC após 25 dias de cultivo e (H) Cultura de MSC na 2^a passagem. As barras de escala representam 200 μm.

Para a caracterização imunofenotípica, as colônias de MSC isoladas de indivíduos controles e indivíduos com HTLV-1 foram expandidas até a terceira passagem, marcadas com anticorpos monoclonais contra 18 antígenos de superfície celular e analisadas por citometria de fluxo. Todas as células isoladas de indivíduos controles e indivíduos com HTLV-1 apresentaram características imunofenotípicas de MSC, com alta expressão CD90, CD73, CD105, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD166 e HLA-ABC, expressão intermediárias de CD146, CD54, e CD106, baixa expressão de HLA-DR e CD51/61 e ausência de expressão de CD14, CD34, CD31 e CD45 (Apêndice 7). Quando comparamos o perfil imunofenotípico das MSC isoladas de indivíduos controles e MSC de indivíduos com HTLV-1, nenhuma diferença significativa foi encontrada (Figura 24 A).

A seguir, foi avaliada a capacidade de diferenciação das MSC isoladas de indivíduos controles e de indivíduos com HTLV-1 em células da linhagem mesodérmica (adipócitos e osteócitos). Após a indução da cultura com meios apropriados para diferenciação adipogênica, observou-se alterações na morfologia celular e a formação de vacúolos lipídicos, visualizados através da coloração Sudan II/Escarlate em todas as amostras de MSC independente do estado clínico (Figura 24 C III a VIII). O potencial de diferenciação em osteócitos foi observado pela análise da expressão de mRNA do gene *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2) que revelou que este gene estava 3,1 a 5,8 vezes mais expresso em MSC que sofreram diferenciação em osteócitos do que em MSC não diferenciadas (Figura 24 B).

Figura 24. Caracterização imunofenotípica e plasticidade celular das MSC isoladas de indivíduos controles e de indivíduos infectados pelo HTLV-1. A) Caracterização imunofenotípica da percentagem de células marcadas com anti-CD73, anti-CD90, anti-CD105, anti-45, anti-CD34 e anti-CD14 avaliadas por citometria de fluxo. Os dados são apresentados como médias $\pm$ SEM. B) Análise da expressão do gene RUNX2 durante a diferenciação em osteoblastos, determinada por qRT-PCR; SD: MSC sem indução da diferenciação; OST: MSC induzida a diferenciação em osteócitos; C) Diferenciação celular das MSC em adipócitos após coloração com Sudan II- escarlata. (I) MSC controle sem diferenciação corada com hematoxilina/eosina; (II) Diferenciação em adipócitos das MSC controle; (III-V) MSC isolada de indivíduos HTLV-1⁺ assintomáticos (HAC) diferenciadas em adipócitos e (VI e VIII) MSC isolada de indivíduos HTLV-1⁺ HAM/TSP após diferenciação em adipócitos.

4. Detecção de infecção pelo HTLV-1 em MSC de medula óssea de indivíduos HTLV-1⁺

De acordo com os resultados *in vitro* descritos anteriormente neste trabalho, o HTLV-1 foi capaz de produzir uma infecção produtiva em MSC. No entanto, não é conhecido se as MSC isoladas de indivíduos com HTLV-1 e cultivadas *ex vivo* podem estar infectadas pelo HTLV-1. Para responder esta questão, foi investigada a presença do pró-vírus em amostras de DNA de MSC isoladas de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e indivíduos controles. Como mostrado na Figura 25, a análise por PCR mostra uma amplificação do fragmento referente ao gene *LTR* (253 bp) do HTLV-1 em apenas duas amostras de MSC isoladas de indivíduos assintomáticos (HAC22 e HAC33) e duas amostras de MSC isoladas de indivíduos

HAM/TSP (HAM01 e HAM16). Nenhuma amplificação foi observada nas MSC HAM28 e HAC25 assim como nas culturas MSC controle (Figura 25). Para garantir que o fragmento amplificado corresponde ao HTLV-1, as amostras de DNA amplificadas foram sequenciadas e posteriormente comparadas com a sequência de DNA da linhagem MT-2 HTLV-1⁺. Após a comparação utilizando a ferramenta BLAST, foi certificado que as amostras de DNA das MSC obtida dos indivíduos HAM/TSP e HAC possuem 95% de similaridade com o HTLV-1.

Figura 25. Detecção de HTLV-1 por PCR em MSC isoladas de indivíduos HTLV-1⁺. Amplificação por PCR do fragmento de DNA referente ao (A) gene β -globina (659 bp) e ao (B) gene LTR (253 bp) do HTLV-1. Gel de agarose (1%) corado com GelRed após a eletroforese. Amostras de DNA extraídas de MSC obtidas de indivíduos controle não infectados (CT01, CT02 e CT03); amostras de DNA extraídas de MSC obtidas de indivíduos infectados HTLV-1 e com HAM/TSP (HAM01, HAM16 e HAM28); amostras de DNA extraídas de MSC obtidas de indivíduos HTLV-1⁺ assintomáticos (HAC22, HAC25 e HAC33); MT-2 DNA (controle positivo) e o controle negativo da reação (Bco); A raia M mostra o marcador de peso molecular (A) e Φ X 174 (fragmentos 72; 118; 194; 234; 271; 281; 310; 603; 872; 1078; 1353) (B) 1Kb (fragmentos 100; 200; 300; 400; 500; 600; 700; 900; 1000). (C) Análise comparativa por BLAST da sequência de DNA do gene *tax* amplificada por PCR e sequenciada pelo método de *Sanger*.

Com o objetivo de utilizar uma metodologia com maior sensibilidade que permite a amplificação de amostras de DNA com baixo número de cópias virais, foi realizada uma

análise utilizando o PCR em tempo real para detecção do gene *pol* do HTLV-1 nas amostras de MSC obtidas dos indivíduos HTLV-1⁺. De acordo com a Figura 26, quando utilizamos uma concentração final de 500 ng de DNA, detectamos uma amplificação com valor de *cycle threshold* (C_T) tardio (CT36 a CT41) na amostra de MSC HAC22 (Figura 26 G) obtida de um indivíduo assintomático para o HTLV-1 e nas amostras HAM01 e HAM16 (Figura 26 D e E) obtidas de indivíduos com HAM/TSP. Para as amostras de MSC provenientes de indivíduos controle não foi observada amplificação para o gene *pol* do HTLV-1. Todas as amostras apresentaram amplificação para o gene da β globina, evidenciando a integridade do material genético utilizado neste ensaio (Figura 26).

Figura 26. Análise por PCR em tempo real das MSC obtidas de indivíduos HTLV-1⁺. Reação de PCR em tempo real multiplex mostrando a amplificação do gene da β globina e do gene *pol* do HTLV-1. Amostras de DNA extraídas de MSC obtidas de indivíduos controle não infectados (CT01, CT02 e CT03); amostras de DNA extraídas de MSC obtidas de indivíduos infectados HTLV-1 e com HAM/TSP (HAM01, HAM16 e HAM28); amostras de DNA extraídas de MSC obtidas de indivíduos HTLV-1⁺ assintomáticos (HAC22, HAC25 e HAC33); MT-2 DNA (controle positivo) e o controle negativo da reação (NTC); Tabela resumindo os valores de *cycle threshold* (C_T) obtidos na reação de PCR em tempo real.

Com a finalidade de avaliar a quantidade de DNA proviral integrado no genoma das MSC isoladas de indivíduos infectados pelo HTLV-1, foi determinado a carga proviral nestas amostras. Para este experimento, foi construída uma curva padrão com o DNA extraído da linhagem MT-2 (HTLV-1⁺) diluindo o DNA em seis ordens de magnitude (10^5 - 10^0 cópias por reação). A Figura 27 mostra que todos os pontos da curva apresentaram amplificação adequada para o gene da β actina (ACTB) (*slope* -3.41; *Y-intercept* 36,15; R^2 0.99; *efficiency*, 96,62) e para o gene *pol* do HTLV-1 (*slope* -3,45; *Y-intercept* 35,76; R^2 0.99; *efficiency*, 95,07). A seguir, verificamos que o nível da carga proviral variou de 2,5 a 25,7 cópias/ 10^5

células nas amostras de MSC provenientes dos indivíduos HTLV-1⁺. Entretanto, nas amostras de PBMC destes mesmos pacientes a quantificação da carga proviral foi de 281,13 a 23.439,86 cópias/10⁵ células (Figura 27).

Figura 27. Detecção da carga proviral para HTLV-1 em amostras de MSC obtidas de indivíduos infectados pelo HTLV-1. A) Características do PCR em tempo real mostrando a amplificação da curva padrão para o gene da β actina (ACTB) e *pol* do HTLV-1; B) Tabela com os resultados da carga proviral para HTLV-1 em amostras de PBMC e MSC; C) Análise comparativa da quantificação da carga proviral (CPV) em amostras de indivíduos portadores assintomático do HTLV-1 (HAC) e indivíduos com paraparesia espástica tropical /mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP).

Uma vez que a análise molecular por PCR mostrou que as MSC isoladas de indivíduos com HTLV-1 podem estar infectadas, foi avaliada também a expressão da proteína reguladora TAX do HTLV-1 nestas células por citometria de fluxo. Conforme os resultados da Figura 28, a proteína TAX foi detectada em 91,5% das células MT-2 (HTLV-1⁺). Entretanto, apenas 5,7 % das células de uma única amostra de MSC (MSC HAM01) isolada de indivíduos com HAM/TSP apresentou expressão da proteína TAX. As outras amostras de MSC isoladas de indivíduos HTLV-1⁺ e as amostras isoladas de indivíduos controles não apresentaram expressão da proteína TAX (Figura 28). Nenhuma marcação específica para TAX foi evidenciada no isotipo controle (Figuras 28 B, E e H).

Figura 28. Expressão da proteína TAX nas MSC isoladas de indivíduos infectados com HTLV-1. Análise por citometria de fluxo da percentagem de células expressando a proteína TAX do HTLV-1. (A, D e G) gráfico “dot plot” SSCxFSC mostrando o tamanho e complexidade celular; (B) histograma mostrando a percentagem de células expressando TAX; (B, E e H) células incubadas apenas com anticorpo secundário. Amostras de MSC obtidas de indivíduos controle (MSC CT); MSC obtidas de indivíduos infectados HTLV-1 e com HAM/TSP (HAM01, HAM16 e HAM28); MSC obtidas de indivíduos HTLV-1⁺ assintomáticos (HAC22, HAC25 e HAC33); Células MT-2 HTLV-1⁺ (controle positivo).

A seguir, verificamos a expressão da proteína *p19* do HTLV-1 nas MSC isoladas de indivíduos com HTLV-1 por microscopia confocal. Conforme mostrado na Figura 29 (E e F), foi observada uma discreta marcação para a proteína *p19* do HTLV-1 em todas MSC isoladas de indivíduos HAM/TSP (Figura 29 B, E, H), no entanto, pouco sinal para *p19* foi obtido nas MSC isoladas de indivíduos assintomáticos (Figura 29 N, Q, T). No caso das células MT-2, uma marcação bem evidente para *p19* foi observada em toda população celular (Figura 29 X) e nas culturas de MSC controle não foi observada nenhuma evidência de sinal específico para *p19* (Figura 29 K).

Figura 29. Análise da expressão da proteína p19 do HTLV-1 por microscopia confocal. Imunofluorescência das MSC obtidas de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e MSC isoladas de indivíduos controle. (A - I) MSC isoladas de indivíduos HTLV-1⁺ com HAM/TSP; (M-U) MSC isoladas de indivíduos infectados com HTLV-1 assintomáticos; (J - L) MSC isoladas de indivíduos controle; (V - W) Células MT-2; (A, D, G, J, M, P, S e V) Núcleo celular corado com DAPI (azul); (B, E, H, K, N, Q, T e X) células marcadas com anti-CD19 (verde); (C, F, I, L, O, R, U e W) sobreposição de DAPI (azul) e anti-CD19 (verde). As barras de escala representam 10 mM.

A produção de antígenos virais liberados no sobrenadante da cultura celular das MSC isoladas de indivíduos com HTLV-1 também foi avaliada através da quantificação da proteína viral p19 do HTLV-1 por ELISA. De acordo com a Figura 30, não foi possível detectar níveis de produção do antígeno p19 no sobrenadante das MSC isoladas de indivíduos com HTLV-1. Entretanto, o ensaio de ELISA utilizado possui um limite de detecção de 25 pg/mL, podendo não acusar reatividade em amostras com baixo nível de infecção. Neste sentido, o sobrenadante de MSC da cultura de MSC de indivíduos HTLV-1 foi filtrado (0,45µm) e concentrado 26 vezes antes da realização do ensaio de ELISA. Os resultados apresentados na Figura 30 mostram que mesmo após a concentração do sobrenadante não foi possível detectar o antígeno p19 no sobrenadante das MSC isoladas de indivíduos com HTLV-1.

Figura 30. Detecção do antígeno p19 do HTLV-1 por ELISA em MSC. Quantificação por ELISA do antígeno p19 presente no sobrenadante da cultura de células. As barras em cinza representam a curva padrão do antígeno p19. Sobrenadante de MSC obtidas de indivíduos controle sem concentrar (Sob. MSC CT) e concentrado (Sob. MSC CT[]); sobrenadante de MSC obtidas de indivíduos HTLV-1⁺ assintomáticos sem concentrar (Sob. MSC HAC) e concentrado (Sob. MSC HAC[]); sobrenadante de MSC obtidas de indivíduos infectados HTLV-1 com HAM/TSP sem concentrar (Sob. MSC HAM/TSP) e concentrado (Sob. MSC HAM/TSP[]).

Considerando que o principal alvo celular da infecção por HTLV-1 são as células T CD4⁺, foi questionado se as MSC isoladas de indivíduos com HTLV-1 possuem a habilidade de transmitir a infecção para PBMC ou células T CD4⁺. Desta forma, realizamos ensaios de co-cultivo com MSC provenientes de indivíduos com HTLV-1 e amostras de PBMC ou linfócitos T CD4⁺ isoladas de indivíduos controles. Após seis dias de co-cultivo os linfócitos foram coletados para extração de DNA e para posterior análise por PCR em tempo real do gene *pol* do HTLV-1. De acordo com a Figura 31, nenhuma das amostras de linfócitos T CD4⁺ ou de PBMC co-cultivadas apresentou amplificação para o gene *pol* do HTLV-1 (Figura 31). No entanto, foi possível observar amplificação para o gene da β globina em todas as amostras testadas, evidenciando a integridade do DNA utilizado nas reações de PCR em tempo real.

Figura 31. Detecção do HTLV-1 em amostras de linfócitos T co-cultivadas com MSC obtidas de indivíduos HTLV-1⁺. Reação de PCR em tempo real multiplex mostrando a amplificação do gene da β globina (seta preta) e do gene *pol* do HTLV-1 (seta vermelha). Amostras de DNA extraídas de PBMC ou células T CD4⁺ após o co-cultivo com MSC obtidas de indivíduos HTLV-1⁺; MT-2 DNA (controle positivo) e o controle negativo da reação (NTC). HAC: portador assintomático do HTLV-1; HAM/TSP: indivíduo com paraparesia espástica tropical /mielopatia associada ao HTLV-1.

Para auxiliar na visualização dos resultados, foi sumariado em uma tabela todos os ensaios e seus respectivos resultados sobre a detecção da infecção por HTLV-1 em MSC provenientes da MO de indivíduos HTLV-1⁺ (Tabela 4).

Tabela 4. Detecção do HTLV-1 por diferentes metodologias em amostras de MSC obtidas de indivíduos controles e indivíduos HTLV-1⁺.

Detecção do HTLV-1						
Amostra	TAX Citometria de Fluxo	p19 (GAG) Confocal	p19 ELISA	PCR HTLV-1 <i>Tax/LTR</i>	PCR em Tempo real HTLV-1 <i>pol</i>	CPV HTLV-1 <i>pol</i>
MSC Controle 01	-	-	-	-/-	-	-
MSC Controle 02	-	-	-	-/-	-	-
MSC Controle 03	-	-	-	-/-	-	-
MSC HTLV-1 HAC22	-	+	-	+/+	+	+
MSC HTLV-1 HAC25	-	+	-	-/-	-	+
MSC HTLV-1 HAC33	-	+	-	-/+	-	+
MSC HTLV-1 HAM/TSP01	+	+	-	+/+	+	+
MSC HTLV-1 HAM/TSP16	-	+	-	+/+	+	+
MSC HTLV-1 HAM/TSP28	-	+	-	-/-	-	-

(+) resultado positivo; (-) resultado negativo; CT: indivíduo controle; HAC: portador assintomático do HTLV-1; HAM/TSP: indivíduo com paraparesia espástica tropical /mielopatia associada ao HTLV-1.

5. Diferenças entre MSC isoladas de indivíduos controles e indivíduos HTLV-1⁺

Com o objetivo de avaliar as alterações entre o perfil de expressão gênica das MSC dos indivíduos HTLV-1⁺ assintomáticos e indivíduos com HAM/TSP foram realizadas análises por *microarray*.

Inicialmente, os dados obtidos foram normalizados para a exclusão das sondas controle, mantendo apenas as sondas com expressão 10% superior a expressão do controle negativo. Para seleção dos genes diferencialmente expressos, os dados obtidos de cada *microarray* foram processados e após serem avaliados restaram 33.735 sondas aptas para serem comparadas (Figura 32).

Figura 32. Normalização dos dados de microarray. Normalização mostrando as sondas aptas que estão representadas como pontos dispersos.

Por meio das análises de agrupamento hierárquico, as MSC dos indivíduos infectados com HTLV-1 (HAC e HAM/TSP) foram avaliadas de acordo com as similaridades e diferenças no perfil de expressão gênica. Foi observado que as amostras de MSC dos indivíduos HTLV-1 não se agruparam de acordo com seu estado clínico. Os indivíduos assintomáticos (HAC25 e HAC22) possuem grande similaridade no perfil de expressão gênica, fazendo parte do mesmo agrupamento. Entretanto, a amostra HAC33 se agrupou com as amostras de MSC de indivíduos portadores de HAM/TSP (Figura 33). Surpreendentemente, a amostra (HAM 28) formou um agrupamento distinto, mostrando pouca similaridade com as outras amostras (Figura 33).

Figura 33. Agrupamento hierárquico das MSC isoladas de indivíduos HTLV-1⁺. O agrupamento hierárquico foi gerado utilizando o parâmetro distância euclidiana com base na expressão das sondas de maior variância. A coloração do *cluster* é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave no topo do *cluster*.

Para avaliar a expressão diferencial, apenas os genes com *fold change* ≥ 2.0 e com p valor $\leq 0,005$ foram selecionados. A comparação entre o grupo HAM/TSP e HAC revelou dois genes diferencialmente expressos fazendo com que ocorram dois agrupamentos distintos de acordo com o estado clínico (HAM e HAC). Os genes diferencialmente expressos foram: proteína ribossomal L10 e catepsina B (CTSB), sendo que o gene referente à proteína ribossomal L10 estava menos expresso em HAM/TSP e o CTSB estava mais expresso neste mesmo grupo de indivíduos (Figura 34).

Figura 34. Análise dos genes diferencialmente expressos entre a comparação MSC HAM/TSP VS. MSC HAC. Agrupamento dos genes de acordo com a similaridade de expressão. As colunas são organizadas pelo tipo de amostras (HAM/HAC) e as linhas pelos genes. A coloração do *cluster* é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave no topo do *cluster*.

V. DISCUSSÃO

Desde a descoberta do HTLV-1, diversos trabalhos científicos auxiliaram no entendimento das propriedades do vírus, das características clínicas das doenças associadas ao HTLV-1, bem como da resposta imunológica do hospedeiro contra a infecção por HTLV-1. No entanto, muitas questões ainda necessitam ser esclarecidas, como o exato mecanismo que desencadeia o desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1 e a habilidade com que o vírus permite a continuidade da infecção latente ao longo da vida do indivíduo.

Nesse trabalho, foram avaliados três pontos importantes da infecção por HTLV-1. Em primeiro lugar, buscou-se entender se as propriedades de imunomodulação das MSC eram eficazes em linfócitos infectados pelo HTLV-1. Em segundo lugar, foi avaliado se o contato com este vírus *in vitro* alteraria as propriedades das MSC e a susceptibilidade das MSC a infecção pelo HTLV-1. Por fim, foi investigado se na MO de indivíduos infectados pelo HTLV-1 podem ser encontradas células MSC contendo o vírus.

Em relação à imunomodulação, os resultados desse trabalho mostram que as MSC são capazes de exercer um efeito inibidor na expressão de genes virais de linfócitos T infectados pelo HTLV-1. A expressão do mRNA de *tax* e do antígeno p19 do HTLV-1 foi menor após o co-cultivo das linhagens celulares infectadas (MT-2 ou HUT-102) com MSC. Além disso, o co-cultivo de MSC com PBMC provenientes de indivíduos infectados proporcionou uma inibição significativa na expressão do gene *pol*, que também pode ser notada na secreção da proteína p19 do HTLV-1. Dados similares foram descritos por Kinpara e cols. (2009) que observaram uma diminuição significativa na expressão de *gag* em linfócitos T infectados pelo HTLV-1 após o co-cultivo com células estromais de camundongos. Os autores sugerem que a supressão viral ocorreu em resposta à secreção das citocinas interferon-beta (IFN- β) e interferon-alfa (IFN- α) pelas células estromais (KINPARA et al., 2009). No entanto, diferente do trabalho de Kinpara e cols. (2009) no presente trabalho foram utilizadas células estromais humanas provenientes da MO de indivíduos saudáveis. Além disso, os dados obtidos indicam que a supressão viral ocorreu devido ao efeito imunossupressivo das MSC sobre os linfócitos T alorreativos, pois a proliferação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ isolados de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foi significativamente menor quando co-cultivado com MSC.

Em relação à imunomodulação no ambiente viral, prévios trabalhos da literatura têm investigado a capacidade imunossupressora das MSC durante infecções por outros vírus, como o vírus *Epstein Barr* (EBV), adenovírus e citomegalovírus (HCMV) (LUCCHINI et al., 2012; KARLSSON et al., 2008). Neste caso, os autores questionaram o impacto das MSC sobre as CTL durante a resposta imune antiviral, uma vez que o efeito imunossupressor destas células não é específico. Desta forma, a infusão de MSC em indivíduos imunocomprometidos poderia suprimir a resposta imune a patógenos e resultar em uma maior susceptibilidade a complicações por infecções. Foi relatado, que as MSC têm efeito imunomodulador diferencial na infecção viral, não impedindo a proliferação de CTL específicas para o vírus, mas permitindo a produção de INF- γ induzida pelo vírus (KARLSSON et al., 2008). Portanto, o uso de MSC no transplante alogênico de células-tronco não aumenta a severidade do curso da doença e nem o risco de reativação viral por HCMV (LUCCHINI et al., 2012).

De acordo com os resultados descritos no presente trabalho, os mecanismos de supressão dos linfócitos T usados pela MSC na infecção pelo HTLV-1 são similares ao que ocorre em condições fisiológicas. As moléculas imunoreguladoras IDO, PGE2 e VCAM-1 foram significativamente mais expressas nas MSC que foram co-cultivadas com células MT-2. Esse resultado também foi observado quando as MSC foram co-cultivadas com PBMC isoladas de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (HAC e HAM/TSP). A relação do efeito imunossupressor das MSC e a expressão de moléculas incluindo TGF- β 1, IDO, PGE2, VCAM-1 e NO tem sido descrita por vários trabalhos da literatura (MEISEL et al., 2004; AGGARWAL et al., 2005; TRENTO & DAZZI., 2010). A atividade de IDO causa a depleção na síntese de triptofano e quinurenina, inibindo o crescimento e a função das células imunes devido à falta de nutrientes ou pela toxicidade direta no seu catabolismo (FRUMENTO et al., 2002). Os efeitos imunossupressores da PGE2 estão relacionados com a modulação no perfil de secreção de citocinas em especial IL-2 e IFN- γ , alterando de um ambiente inflamatório para anti-inflamatório (ENGLISH et al., 2007).

As propriedades de imunomodulação das MSC também dependem de sinais externos. Por exemplo, as MSC tratadas *in vitro* com padrões moleculares específicos associados a patógenos (PAMP) podem tornar-se anti- ou pró-inflamatórias, dependendo do PAMP com o qual elas interagem (TOMCHUCK et al, 2008; WATERMAN et al, 2010; LE BLANC & MOUGIAKAKOS, 2012; AULETTA et al., 2012). Este comportamento diferenciado das MSC deve-se ao fato de que estas células

expressam os receptores do tipo *toll-like* 3 e 4 (TLR3 e TLR4), que reconhecem RNA dupla fita (dsRNA), RNA simples fita (ssRNA) e produtos bacterianos. A interação dos TLR3 e TLR4 com um patógeno está associada com a inibição da atividade das MSC em suprimir a proliferação de linfócitos T CD4⁺, sem influenciar no imunofenótipo ou na plasticidade celular das MSC (LIOTTA et al., 2007). Por outro lado, também já foi demonstrado que o estímulo provocado pelos PAMP nos TLR3 e TLR4 aumenta as propriedades imunossupressoras das MSC via IFN- β e IDO-1 (OPITZ et al., 2009). Com base nestes achados, era esperado que a atividade das MSC em um microambiente infeccioso, ou seja, na presença de células infectadas pelo HTLV-1, fosse diferenciada. Entretanto, neste estudo, não foi encontrado um efeito diferenciado em relação à imunossupressão, pois o co-cultivo de MSC com linfócitos obtidos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e linfócitos isolados de indivíduos saudáveis foi similar.

No presente trabalho, também foram realizados experimentos com o intuito de compreender a influência do HTLV-1 sobre as características biológicas e funcionais de MSC derivadas da MO. Foi observado, que as MSC expostas ao HTLV-1 *in vitro*, exibiram características distintas daquelas MSC cultivadas sob condições controle. Essa observação foi evidenciada quando o contato das MSC com HTLV-1 resultou no acúmulo de vesículas no citoplasma das MSC. Estruturas semelhantes foram observadas quando o HTLV-1 infectou células HeLa, Jurkat ou PBMC humanas primárias (vacúolos autofágicos). De acordo com a literatura, o acúmulo de autofagossomos é induzido pela proteína TAX e pode beneficiar a replicação viral do HTLV-1 (TANG et al., 2013).

As moléculas de superfície ICAM-1, VCAM-1 e HLA-DR, foram mais expressas em MSC após o contato com HTLV-1. Adicionalmente, PBMC isoladas a partir de indivíduos sintomáticos infectados pelo HTLV-1 também foram capazes de modular a expressão de VCAM-1 e HLA-DR em MSC, mesmo sem o contato direto célula-célula. As glicoproteínas ICAM-1 e VCAM-1, membros da superfamília das imunoglobulinas, são expressas principalmente em células endoteliais e células do sistema imunológico e estão relacionadas com os processos de reconhecimento, interação e adesão celular. Estudos anteriores relatam que a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas podem ser induzidas nas MSC após o estímulo com citocinas inflamatórias (REN et al., 2008, 2010). Além disso, o plasma de indivíduos com HAM/TSP apresenta uma maior concentração de citocinas pró-inflamatórias, em comparação com o de indivíduos assintomáticos (STARLING et al., 2012). Desta

forma, acreditamos que a presença de altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6 e IFN- γ na infecção por HTLV-1 seriam responsáveis por modular a expressão das moléculas de adesão em MSC.

Outro ponto relevante apontado por estudos anteriores é o fato da atividade das MSC ser modulada de forma distinta dependendo do ambiente (WATERMAN et al., 2010). Assim, os estímulos gerados em ambientes com infecções virais podem melhorar a capacidade imunossupressora promovida pelas MSC, devido a um aumento na expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1) (REN et al., 2010). Neste sentido, é possível que as MSC previamente expostas ao HTLV-1 possuam um efeito imunossupressor diferenciado em linfócitos T, uma vez que ICAM-1 e VCAM-1 modulam as propriedades de imunorregulação das mesmas. Dados similares foram encontrados na infecção de MSC por HCMV. Os autores observaram um aumento significativo nos níveis de expressão de ICAM-1 (CD54) e LFA-3 (CD58) em resposta à infecção por CMV e este aumento foi associado a uma maior adesão de células hematopoiéticas as MSC infectadas com CMV (SMIRNOV et al., 2007).

Por outro lado, o aumento na expressão de moléculas de adesão (ICAM-1 e VCAM-1) em MSC que foram expostas ao HTLV-1 favorece o contato entre os linfócitos infectados e as MSC, podendo promover a infecção pelo HTLV-1 em MSC residentes na MO. Durante a infecção por HTLV-1, as moléculas ICAM-1 e LFA-1 são moduladas nas células T (BARNARD et al., 2005) e a expressão destas moléculas são importantes para a fusão celular e disseminação do HTLV-1, permitindo o contato célula-célula, com polarização do citoesqueleto e a formação da sinapse viral (IGAKURA et al., 2003).

No que diz respeito à expressão de HLA-DR, tem sido demonstrado que a expressão de HLA-DR em MSC depende da concentração de IFN- γ (CHAN et al., 2006). Após a exposição a antígenos, as doses iniciais de IFN- γ induzem a expressão de moléculas do MHC-II e assim, facilitam as propriedades de apresentação de antígenos pelas MSC. No entanto, a exposição em níveis elevados de IFN- γ , regula negativamente a expressão de MHC-II e provoca uma perda da capacidade das MSC em agir como células apresentadoras de antígenos (APC) (STAGG et al., 2006; ROMIEU-MOUREZ et al., 2007). Outras moléculas típicas de superfície que são comumente usados na caracterização das MSC, como CD271 e CD13, também foram moduladas pelo contato com HTLV-1. Estudos relataram o envolvimento de CD13 em outras infecções, como por exemplo, na infecção por HCMV, pois CD13 pode atuar como um receptor

(SODERBERG et al., 1993). No entanto, novos estudos devem ser conduzidos para compreender as diferenças na expressão destas moléculas em MSC expostas ao HTLV-1.

A capacidade funcional das MSC em se diferenciar em adipócitos e osteócitos não foi alterada em MSC expostas ao HTLV-1. Esta constatação foi confirmada pelas análises nos níveis de expressão dos genes PPAR γ e RUNX-2. Trabalhos anteriores relatam que o HTLV-1 pode estar associado a alterações ósseas, aumentando a população ativa de osteoclastos em pacientes ATLL (KIYOKAWA et al., 1987). Estas alterações, provavelmente não estão relacionadas com a exposição de MSC ao HTLV-1, porque foi observado que o HTLV-1 não prejudicou o potencial de diferenciação osteogênico desta população de células. Acredita-se que as alterações observadas nos osteoclastos de indivíduos ATLL e em células infectadas pelo HTLV-1 que são mantidas em cultura podem surgir devido a maior expressão e secreção de citocinas específicas que estimulam a proliferação dos precursores de osteoclastos e promovem a sua diferenciação (TENDLER et al., 1991). Outros autores avaliaram o potencial de diferenciação das MSC durante a infecção por HIV e mostraram que a proteína viral p55-gag afeta a osteogênese com redução na deposição de cálcio e no nível de expressão de RUNX-2. No entanto, os níveis de lipídios e a atividade do gene PPAR γ foram aumentadas pela exposição das MSC as proteínas do HIV durante a diferenciação adipogênica das MSC (COTTER et al., 2007, 2008, 2011). Experimentos realizados com soros de indivíduos infectados com HIV com alta carga viral induzem um fenótipo pró-adipogênico nas MSC, como evidenciado pelo aumento na formação de adipócitos e a expressão do gene PPAR γ (COTTER et al., 2011). A infecção pelo HIV também foi relacionada com a desregulação na proliferação e diferenciação osteogênica de MSC isoladas de camundongos TG26 HIV-1 (camundongo transgênico que contém HIV), sugerindo que a infecção progressivamente causa danos à funcionalidade das MSC (CHENG et al., 2013).

Este trabalho é o primeiro a relatar que a interação *in vitro* entre MSC derivadas da MO com células infectadas pelo HTLV-1 leva à infecção das MSC. De fato, a presença do provírus do HTLV-1 foi evidenciada apenas nas MSC que tiveram contato direto com células infectadas e não com partículas virais livres de células. Esses dados sugerem que o contato direto com uma célula infectada é eficiente para a infecção viral das MSC. Estes resultados suportam a hipótese de que a principal via de transmissão

para a infecção pelo HTLV-1 ocorre através do contato célula-célula, porque partículas virais livres de células são muito pouco infecciosas *in vitro* (DONEGAN et al., 1994). No entanto, em outros tipos celulares, tais como células dendríticas, uma eficiente infecção produtiva foi observada com partículas de HTLV-1 livre de células (JONES et al., 2008).

Outros estudos foram realizados para elucidar a susceptibilidade das MSC à infecção por vírus e as possíveis consequências do contato de MSC com agentes infecciosos. De acordo com dados da literatura, o vírus da herpes (HSV-1) é capaz de infectar as MSC *in vitro* e induzir um efeito citopático, como evidenciado por meio de sinais de inchaço e desprendimento das membranas (SUNDIN et al., 2006). Recentemente, Avanzi e cols. (2013) demonstraram que MSC derivadas da membrana fetal (FM-MSC) são totalmente permissíveis a infecções pelo vírus da herpes simplex 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), vírus da varicela zoster (VZV) e citomegalovírus humano (HCMV), mas não com o vírus de *Epstein-Barr* (EBV) e herpes vírus humano 6, 7, e 8 (HHV-6, 7, e 8). Embora esses vírus sejam capazes de entrar nas FM-MSC, a expressão do gene viral ocorre de forma transitória e limitada (AVANZI et al., 2013).

Conforme visto anteriormente, a maioria das informações pertinentes à infecção das MSC por agentes virais patogênicos provém de ensaios de infecção *in vitro* utilizando partículas virais de linhagens celulares infectadas. No entanto, a susceptibilidade das MSC a infecção pelo HTLV-1 no seu microambiente necessita de maior investigação. Portanto, nosso próximo passo foi investigar a presença do HTLV-1 na medula óssea de indivíduos infectados e os efeitos desta infecção no nicho medular.

A análise da MO de indivíduos infectados pelo HTLV-1 revelou um aumento de linfócitos T CD4⁺ nesse grupo de indivíduos, quando comparados com controles saudáveis. De acordo com a literatura, a infecção por HTLV-1 pode estar relacionada com um aumento na proliferação de linfócitos no sangue periférico de indivíduos com mielopatia (ITOYAMA et al., 1988). Outro fato curioso, é que no presente trabalho foi observada a presença de linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1 na MO de todos os indivíduos infectados analisados, independentemente do estado clínico HAM/TSP ou HAC. A existência da infecção latente na MO de pacientes com HAM/TSP foi demonstrada anteriormente por Levin e cols. (1997). Entretanto, neste caso não havia sido determinado o tipo celular infectado pelo HTLV-1, bem como não era conhecido se na MO de portadores assintomáticos do HTLV-1 era possível detectar a infecção (LEVIN et al., 1997). Em nosso trabalho, foi demonstrado pela primeira vez, que as

células T CD4⁺ isoladas a partir de indivíduos HTLV-1 positivos contêm níveis elevados de infecção por HTLV-1. Dados que suportam este achado também foram descritos por um trabalho que relatou uma possível transmissão do HTLV-1 após o transplante alogênico de MO. Foi utilizado uma amostra de MO de um indivíduo portador assintomático para o HTLV-1 e um receptor com sorologia negativa para o HTLV-1. Alguns dias após o transplante, foi possível detectar anticorpos específicos contra o HTLV-1 no soro do receptor da MO (KIKUCHI et al., 2000). É provável que a infecção pelo HTLV-1 observada no indivíduo receptor da MO ocorreu devido a presença de linfócitos T CD4⁺ infectados na MO do doador, uma vez que o transplante foi realizado sem a depleção de células T. Além disso, estudos *in vivo* realizados com pacientes ATLL tem detectado o DNA proviral do HTLV-1 em células mononucleares da MO, mas não em células hematopoiéticas (CD34⁺) (NAGAFUJI et al., 1993). No entanto, também existem alguns casos de ATLL em que se observou a remissão da doença, com a erradicação completa do clone maligno do HTLV-1 após o transplante alogênico de MO (KAWA et al., 1998). Neste caso, acredita-se que a resposta específica das células T CD8⁺ e CD4⁺ contra Tax contribua para a eliminação das células leucêmicas e/ou infectadas, uma vez que o transplante alogênico estimula a expansão de linfócitos T citotóxicos (CTL) específicos contra o HTLV-1 e isso reforça os efeitos do enxerto contra o ATLL (TAMAI et al., 2013).

Desta forma, todos os resultados sugerem que as células T CD4⁺ infectadas pelo HTLV-1 podem transitar entre os compartimentos da medula óssea e sangue periférico e contribuir para persistência do HTLV-1 no organismo. O fato de existirem células T infectadas na MO, também sugere que estas células possam transmitir a infecção para outras células residentes da MO e contaminar por exemplo as MSC. Baseados nesta questão, decidimos investigar a existência de MSC infectadas pelo HTLV-1 na MO de indivíduos acometidos por este vírus e as consequências biológicas desta infecção para as MSC.

Os resultados mostram que a capacidade de formação de colônias fibroblastóides (CFU-F) foi significativamente menor em amostras de indivíduos infectados pelo HTLV-1 quando comparado com o grupo indivíduos controles. Além disso, as amostras de MO de indivíduos com HAM/TSP formaram colônias fibroblastóide com diâmetro menor, quando comparada com as colônias obtidas com as amostras isoladas de indivíduos HTLV-1 assintomáticos ou indivíduos controles. Resultados similares voltados para infecção por HIV foram descritos por Wang e cols. (2002) que

observaram uma inibição significativa no número de colônias grandes quando partículas virais foram adicionadas no momento do ensaio de CFU-F. Neste caso, o HIV não interferiu no número total ou na capacidade de semeadura dos progenitores que dão origem a CFU-F, mas suprimiu significativamente sua taxa de proliferação (WANG et al., 2002).

A análise das MSC isoladas da MO de indivíduos com HTLV-1 ou de controles após serem expandidas em cultura, mostraram características similares em relação a capacidade de aderência ao plástico, morfologia e expressão dos principais marcadores imunofenotípicos. Este dado foi surpreendente, uma vez que nas análises *in vitro* as MSC que entraram em contato com o HTLV-1 apresentaram características fenotípicas distintas com maior expressão das moléculas de superfície ICAM-1, VCAM-1 e HLA-DR. Uma possível explicação para este achado, é que as MSC isoladas de indivíduos infectados convivem constantemente em um ambiente com altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e desenvolveram um mecanismo para manter a expressão das moléculas de superfície em equilíbrio. Porém, as MSC que são desafiadas com partículas virais respondem rapidamente a este estímulo aumentando o nível de expressão de ICAM-1, VCAM-1 e HLA-DR.

Outros trabalhos da literatura caracterizaram MSC isoladas de indivíduos com doenças autoimunes ou inflamatórias como esclerose sistêmica e doença de Crohn (LARGHERO et al., 2008; BERNARDO et al., 2009). Observou-se que estas células são igualmente efetivas às MSC isoladas de indivíduos saudáveis, pois a capacidade de aderência ao plástico, fenótipo e potencial de diferenciação em adipócitos e osteócitos estava preservada, bem como a sua função de suporte à hematopoiese e ação antiproliferativa sobre linfócitos T (LARGHERO et al., 2008; BERNARDO et al., 2009).

Conforme já descrito no presente trabalho, o HTLV-1 pode infectar as MSC *in vitro* e esta infecção também foi observada *ex vivo* em MSC isoladas de indivíduos infectados pelo HTLV-1. A presença de MSC infectadas na MO independe do estado clínico dos indivíduos, pois detectamos MSC positivas para este vírus em amostras de HAM/TSP, assim como nos portados assintomáticos do HTLV-1. A infecção *in vitro* das MSC por diferentes vírus tem sido bem descrita (WEI et al., 2011; SMIRNOV et al., 2007; CHOUDHARY et al., 2011; PARSON et al., 2004), no entanto, não existem trabalhos que explorem a detecção de DNA viral em MSC obtidas de aspirados de MO de indivíduos infectados. Um estudo realizado em pacientes com osteoartrite e

indivíduos saudáveis revelou a existência de MSC infectadas pelo parvovírus humano B19 (B19V) e pelo vírus da varicela zoster (VZV) nos dois grupos estudados, pacientes e indivíduos saudáveis. Entretanto, a prevalência (16 a 20%) e a carga viral (13,5 a 62 cópias/mg de DNA) nas MSC infectadas foi baixa, sugerindo que o risco de reativação ou transmissão viral em casos de transplante utilizando MSC é muito pequeno (ROLLIN et al., 2007). Outro estudo descreve a prevalência 0,05% de MSC infectadas pelo B19V em amostras de doadores saudáveis, mas a análise dos indivíduos transplantados com as MSC infectadas não revelou sinais de viremia ou infecção pelo B19V (SUNDIN et al., 2008). Por outro lado, a infecção das MSC pelo citomegalovírus humano (HCMV), herpes vírus 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) e VZV foi investigada em 12 indivíduos saudáveis com resultados sorológicos positivos e negativos para estes vírus. O DNA viral não foi encontrado em nenhuma amostra de MSC, sugerindo que estas células não estariam infectadas em pacientes sem viremia (SUNDIN et al., 2006).

Em virtude de não existirem trabalhos na literatura que avaliam a presença de MSC infectadas pelo HTLV-1 em seu microambiente biológico, os resultados gerados por este trabalho foram confirmados por várias técnicas moleculares. O DNA proviral para o HTLV-1 foi detectado por *nested-PCR* e PCR em tempo real em quatro das seis amostras de MSC isoladas de indivíduos infectados. Nos ensaios que detectam as proteínas do HTLV-1, somente a microscopia confocal para p19 foi positiva em todas as seis amostras de MSC obtidas de indivíduos infectados. Provavelmente, a detecção de Tax por citometria de fluxo e do antígeno p19 por ELISA não foi possível devido ao limite de detecção destes ensaios. As MSC HTLV-1⁺ possuem um baixo nível de infecção, pois a carga proviral (CPV) em MSC de HAM/TSP foi 400 vezes menor quando comparada com PBMC isoladas destes mesmos indivíduos.

Também foi observado que a maioria (67%) das MSC isoladas de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram positivas para este retrovírus. Este resultado sugere que as MSC também sejam um alvo celular para o HTLV-1 *in vivo*. Contudo, é importante ressaltar que estes resultados foram obtidos com células cultivadas, e não podemos excluir a hipótese de que MSC possam ter sido infectadas *ex vivo*, após o contato com linfócitos T infectados da MO. Além disso, mais estudos são necessários para detectar uma infecção produtiva em MSC isoladas a partir de indivíduos acometidos por essa infecção.

As análises deste trabalho revelam que a infecção por HTLV-1 alterou a frequência de progenitores fibroblastóides mais não modificou o fenótipo e o potencial

de diferenciação em adipócitos e osteócitos das MSC. Outros pontos relevantes, como a habilidade de suporte a hematopoiese e a capacidade de imunomodulação das MSC infectadas ainda devem ser investigados. A manutenção do HTLV-1 no organismo pode estar intimamente relacionada com a infecção das MSC por este retrovírus. Supõe-se que a transmissão e contaminação ocorreria ainda na MO, no momento de suporte da hematopoiese e gênese das células linfóides. Porém, este fenômeno ainda deve ser melhor investigado, pois os ensaios de co-cultivo *in vitro* realizados neste estudo, utilizando MSC HTLV-1⁺ obtidas de indivíduos infectados e PBMC ou linfócitos T CD4⁺ de indivíduos controle, mostram que a MSC não foi capaz de transmitir a infecção por HTLV-1.

O controle exercido pelas MSC na imunomodulação é muito importante para homeostase do sistema imunológico. Portanto, qualquer desregulação nesse sistema, como na função das MSC, acarretaria sérios danos ao organismo. Desta forma, supõe-se que as MSC seriam responsáveis por manter o longo período de latência clínica observado na infecção por HTLV-1. Uma vez infectadas, as MSC perderiam sua função de controle do sistema imunológico, e permitiriam que o vírus se espalhasse, desencadeando o aparecimento das manifestações clínicas associadas ao HTLV-1.

No intuito de avaliar as modificações que as diferentes manifestações clínicas do HTLV-1 podem causar nas MSC, foi avaliado o perfil de expressão gênica em MSC obtidas dos indivíduos com HAM/TSP e MSC obtidas de portadores assintomáticos para o HTLV-1. A técnica utilizada de *microarray*, quantifica a expressão gênica em larga escala, permitindo medir o nível de expressão de milhares de genes simultaneamente (SCHENA et al., 1995; SHALON et al., 1996). Após as análises de agrupamento hierárquico, foi observado que a amostra de MSC HAM28 formou um agrupamento distinto, com pouca similaridade com as outras amostras de MSC. É interessante salientar que esta amostra foi a única que não apresentou DNA proviral para o HTLV-1 nos ensaios com *nested-PCR* ou PCR em tempo real. Portanto, é possível que a ausência do DNA proviral do HTLV-1 nesta célula seja responsável por mantê-la em um agrupamento distinto.

As técnicas de *microarray* e SAGE são consideradas ferramentas valiosas para determinar o perfil de expressão gênica em larga escala. Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou as modificações causadas pelo HTLV-1 em linfócitos CD8⁺ e CD4⁺ utilizando estas metodologias. Foi demonstrado que os linfócitos CD8⁺ de pacientes com HAM/TSP têm níveis elevados de expressão de genes relacionados com a

desgranulação como GZMH e PRF1 e os genes diferencialmente expressos em linfócitos T CD4⁺ estão relacionados principalmente à atividade antiviral, migração celular e lise celular (MALTA et al., 2013; PINTO et al., 2014).

No caso das MSC, a comparação entre o grupo HAC e HAM/TSP revelou apenas dois genes diferencialmente expressos (proteína ribossomal L10 e catepsina B). A expressão da proteína ribossomal L10 está relacionada com a sinalização intracelular, no entanto, outras análises devem ser realizadas para entender seu papel na infecção por HTLV-1. A catepsina B é uma cisteíno-protease lisossomal membro da família da papaína. Suas funções normais conhecidas estão relacionadas com processos celulares, acúmulo de plaquetas, processamento e reciclagem de proteínas. Estudos envolvendo infecções virais revelam uma maior expressão de catepsina B e cistatina B em monócitos de mulheres com demência associada ao HIV (CANTRES-ROSARIO et al., 2013). A secreção aumentada de catepsina B estaria induzindo a apoptose neuronal e contribuindo para neuropatogênese encontrada em alguns pacientes com HIV (RIVERA et al., 2014). Outro trabalho, descreveu que a catepsina B contribui para os eventos apoptóticos induzidos pelo vírus da dengue em células HepG2. O mecanismo sugerido pelos autores, relaciona a redução de catepsina B com a inibição da atividade da caspase 9. Deste modo, a catepsina B seria responsável por ativar a via das caspases 9 e caspase 3 da apoptose (MORCHANG et al., 2013).

Portanto, este trabalho sugere que o HTLV-1 pode alterar características importantes das células MSC, como o número de vesículas intracelulares e a expressão de moléculas da superfície celular. A expressão aumentada das moléculas de adesão da superfície celular poderia implicar em um maior efeito imunossupressor das MSC. No entanto, as análises mostraram que as MSC inibem a linfoproliferação de forma similar em amostras controle e na infecção pelo HTLV-1, sendo tal efeito mediado pela expressão de PGE2 e IDO. A expressão do gene *pol* e da proteína p19 do HTLV-1 também foi menor após o co-cultivo com MSC, indicando que a imunorregulação por MSC é eficaz em células infectadas pelo HTLV-1. O contato direto *in vitro* das MSC com células infectadas pelo HTLV-1 proporcionou uma eficiente infecção das MSC. E finalmente, a análise *ex vivo* mostrou que as MSC isoladas de indivíduos HTLV-1⁺ também são infectadas por este vírus, provavelmente devido ao contato com células T CD4⁺ infectadas pelo HTLV-1 que circulam na MO destes indivíduos. A presença de MSC infectadas pelo HTLV-1 na MO pode impedir significativamente a possibilidade de erradicação da infecção por HTLV-1. Além disso, o vírus pode alterar as funções das

MSC e isso permitiria o desenvolvimento das manifestações clínicas relacionadas ao HTLV-1 (Figura 35).

Figura 35. Suposto mecanismo de interação do HTLV-1 com MSC. A) Ensaio *in vitro* mostram que as MSC modulam a proliferação e a expressão de genes virais em linfócitos T infectados pelo HTLV-1, por outro lado, esse vírus é capaz de infectar e alterar as características biológicas das MSC. B) Linfócitos T e MSC infectadas pelo HTLV-1 são encontradas na MO de indivíduos acometidos por essa infecção. Neste sentido, supõe-se que a continuidade da infecção ou ainda o desenvolvimento das manifestações clínicas associadas ao HTLV-1 possam estar intimamente relacionados com a infecção dessas células.

VI. CONCLUSÕES

- ✓ O presente estudo permitiu entender as propriedades imunomodulatórias das MSC frente a linfócitos infectados pelo HTLV-1;
- ✓ Este é o primeiro estudo que mostra que o contato *in vitro* de MSC com o HTLV-1 altera as propriedades biológicas das MSC;
- ✓ As células MSC são susceptíveis à infecção pelo HTLV-1 *in vitro*;
- ✓ O HTLV-1 não altera o potencial de diferenciação das MSC em adipócitos e osteócitos.
- ✓ Os linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1 circulam na MO de indivíduos sintomáticos e assintomáticos para esta infecção;
- ✓ MSC infectadas pelo HTLV-1 podem ser isoladas da MO de indivíduos acometidos por esta infecção;

Referências Bibliográficas

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, S.; PITTENGER, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**. v.15;105(4), p.1815-1822, 2005.

ALBESIANO, E.; MESSMER, B.T.; DAMLE, R.N.; ALLEN, S.L.; RAI, K.R.; CHIORAZZI, N. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. **Blood**.v.102, p.3333-3339, 2003.

ALBRECHT, B.; COLLINS, N.D.; NEWBOUND, G.C.; RATNER, L.; LAIRMORE, M.D.; Quantification of human T-cell lymphotropic virus type 1 proviral load by quantitative competitive polymerase chain reaction. **J Virol Methods**. v.75(2), p.123-140, 1998.

AULETTA, J.J.; DEANS, R.J.; BARTHOLOMEW, A.M. Emerging roles for multipotent, bone marrow-derived stromal cells in host defense. **Blood**.v.119(8), p.1801-1809, 2012.

AVANZI, S.; LEONI, V.; ROTOLA, A.; ALVIANO, F.; SOLIMANDO, L.; LANZONI, G.; BONSI, L. DI.; LUCA, D.; MARCHIONNI, C.; ALVISI, G.; RIPALTI, A. Susceptibility of human placenta derived mesenchymal stromal/stem cells to human herpesviruses infection. **PLoS One**. v.5;8(8), p.71412, 2013.

AYE, M. M. E.; MATSUOKA, T.; MORITOYO, T.; UMEHARA, F.; SUEHARA, M.; HOKEZU, Y.; YAMANAKA, H.; ISASHIKI, Y.; OSAME, M.; IZUMO, S. Histopathological analysis of four autopsy cases of HTLV-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis: inflammatory changes occur simultaneously in the entire central nervous system. **Acta Neuropathologica**. v.100, no. 3, p.245-252, 2000.

AZAKAMI, K.; SATO, T.; ARAYA, N.; UTSUNOMIYA, A.; KUBOTA, R.; SUZUKI, K.; HASEGAWA, D.; IZUMI, T.; FUJITA, H.; ARATANI, S.; FUJII, R.; YAGISHITA, N.; KAMIJUKU, H.; KANEKURA, T.; SEINO, K.; NISHIOKA, K.; NAKAJIMA, T.; YAMANO, Y. Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders. **Blood**. v.114, p.3208-3215, 2009.

BANGHAM, C.R. The immune response to HTLV-I. **Curr Opin Immunol**.v.12(4), p.397-402, 2000.

BANGHAM, C.R. HTLV-1 infection: role of CTL efficiency. **Blood**. v.112(6), p.2176-2177, 2008.

BANGHAM, C.R. CTL quality and the control of human retroviral infections. **Eur J Immunol**. v.39(7), p.1700-1712, 2009.

BARNARD, A.L.; IGAKURA, T.; TANAKA, Y.; TAYLOR, G.P.; BANGHAM, C.R. Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. **Blood**. v.106(3), p.988-995, 2005.

BARTHOLOMEW, A.; STURGEON, C.; SIATSKAS, M.; FERRER, K.; MCINTOSH, K.; PATIL, S.; HARDY, W.; DEVINE, S.; UCKER, D.; DEANS, R.; MOSELEY, A.; HOFFMAN, R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Exp Hematol**.v.30(1), p.42-48, 2002.

BAZARBACHI, A.; HERMINE, O. Treatment of adult T-cell leukaemia/lymphoma: current strategy and future perspectives. **Virus Res**. v. 30;78(1-2), p.79-92, 2001.

BERNARDO, M.E.; AVANZINI, M.A.; CICCOCIOPPO, R.; PEROTTI, C.; COMETA, A.M.; MORETTA, MARCONI, M.; VALLI, M.; NOVARA, F.; BONETTI, F.; ZUFFARDI, O.; MACCARIO, R.; CORAZZA, G.R.; LOCATELLI, F. Phenotypical/functional characterization of in vitro-expanded mesenchymal stromal cells from patients with Crohn's disease. **Cytotherapy**.v.11(7), p.825-836, 2009.

BEX, F.; GAYNOR, R.B. Regulation of gene expression by HTLV-I Tax protein. **Methods**. v.16(1), p.83-94, 1998.

CAHILL, R.A.; WENKERT, D.; PERLMAN, S.A.; STEELE, A.; COBURN, S.P.; MCALISTER, W.H.; MUMM, S.; WHYTE, M.P. Infantile hypophosphatasia: transplantation therapy trial using bone fragments and cultured osteoblasts. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 92, p.2923-2930, 2007.

CALATTINI, S.; CHEVALIER, S.A.; DUPREZ, R.; BASSOT, S.; FROMENT, A.; MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology.** v. 9, p.2-30, 2005.

CANTRES-ROSARIO, Y.; PLAUD-VALENTÍN, M.; GERENA, Y.; SKOLASKY, R.L.; WOJNA, V.; MELÉNDEZ, L.M. Cathepsin B and cystatin B in HIV-seropositive women are associated with infection and HIV-1-associated neurocognitive disorders. **AIDS.** v. 28;27(3), p. 347-356, 2013.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. **J Orthop Res.**; v.9(5), p.641-650, 1991.

CASTILHO-FERNANDES, A.; DE ALMEIDA, D.C.; FONTES, A.M.; MELO, F.U.; PICANÇO-CASTRO, V.; FREITAS, M.C.; ORELLANA, M.D.; PALMA, P.V.; HACKETT, P.B.; FRIEDMAN, S.L.; COVAS, D.T. Human hepatic stellate cell line (LX-2) exhibits characteristics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Exp Mol Pathol.**v.91, p. 664-672, 2011.

CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; & PROIETTI, F.A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cad Saude Publica.** v.21 (3), p. 926-931, 2005.

CHAN, J.L.; TANG, K.C.; PATEL, A.P.; BONILLA, L.M.; PIEROBON, N.; PONZIO, N.M.; RAMESHWAR, P. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. **Blood.** v.15,107(12), p. 4817-4824, 2006.

CHENG, K.; RAI, P.; LAN, X.; PLAGOV, A.; MALHOTRA, A.; GUPTA, S.; SINGHAL, P.C. Bone-derived mesenchymal stromal cells from HIV transgenic mice exhibit altered proliferation, differentiation capacity and paracrine functions along with impaired therapeutic potential in kidney injury. **Exp Cell Res.** v.15,319(14), p. 2266-2274, 2013.

CHO, I.; SUGIMOTO, M.; MITA, S.; TOKUNAGA, M.; IMAMURA, F.; ANDO, M. In vivo proviral burden and viral RNA expression in T cell subsets of patients with human T lymphotropic virus type-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 53, p. 412-418, 1995.

CHOUDHARY, S.; MARQUEZ, M.; ALENCASTRO, F.; SPORS, F.; ZHAO, Y.; TIWARI, V. Herpes simplex virus type-1 (HSV-1) entry into human mesenchymal stem cells is heavily dependent on heparan sulfate. **J Biomed Biotechnol,** v. 2011, p. 1-11, 2011.

CONGET, P.A.; MINGUELL, J.J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. **J Cell Physiol.** v.181, p. 67-73, 1999.

COOK, L.B.; MELAMED, A.; NIEDERER, H.; VALGANON, M.; LAYDON, D.; FORONI, L.; TAYLOR, G.P.; MATSUOKA, M.; BANGHAM, C.R. The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. **Blood.** v.19,123(25), p. 3925-3931, 2014.

COTTER, E.J.; CHEW, N.; POWDERLY, W.G.; DORAN, P.P. HIV type 1 alters mesenchymal stem cell differentiation potential and cell phenotype ex vivo. **AIDS Res Hum Retroviruses.**v. 27, p. 187-199, 2011.

COTTER, E.J.; IP, H.S.; POWDERLY, W.G.; DORAN, P.P. Mechanism of HIV protein induced modulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. **BMC Musculoskelet Disord,** v. 13, p. 9:33, 2008.

COTTER, E.J.; MALIZIA, A.P.; CHEW, N.; POWDERLY, W.G.; DORAN, P.P. HIV proteins regulate bone marker secretion and transcription factor activity in cultured human osteoblasts with consequent

potential implications for osteoblast function and development. **AIDS Res Hum Retroviruses**.v. 23, p.1521-1530, 2007.

DAVIS, B.R.; SCHWARTZ, D.H.; MARX, J.C.; JOHNSON, C.E.; BERRY, J.M.; LYDING, J.; MERIGAN, T.C.; ZANDER, A. Absent or rare human immunodeficiency virus infection of bone marrow stem/progenitor cells in vivo. **J Virol**. v. 65(4), p.1985-1990, 1991.

DE REVEL, T.; MABONDZO, A.; GRAS, G.; DELORD, B.; ROQUES, P.; BOUSSIN, F.; NEVEUX, Y.; BAHUAU, M.; FLEURY, H.J.; DORMONT, D. In vitro infection of human macrophages with human T-cell leukemia virus type 1. **Blood**, v. 81, p. 1598–1606, 1993.

DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LONGONI, P.D.; MATTEUCCI, P.; GRISANTI, S.; GIANNI, A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**. v.15,99(10), p. 3838-3843, 2002.

DI ROSA, F. T-lymphocyte interaction with stromal, bone and hematopoietic cells in the bone marrow. **Immunol Cell Biol**. v.87(1), p.20-29, 2009.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. v. 8, p. 315–317, 2006.

DONEGAN, E.; LEE, H.; OPERSKALSKI, E.A.; SHAW, G.M.; KLEINMAN, S.H.; BUSCH, M.P.; STEVENS, C.E.; SCHIFF, E.R.; NOWICKI, M.J.; HOLLINGSWORTH, C.G. Transfusion transmission of retroviruses: human T-lymphotropic virus types I and II compared with human immunodeficiency virus type 1. **Transfusion**.v.34, p. 478-483, 1994.

DORRONSORO, A.; FERRIN, I.; SALCEDO, J.M.; JAKOBSSON, E.; FERNÁNDEZ-RUEDA, J.; LANG, V.; SEPULVEDA, P.; FECHTER, K.; PENNINGTON, D.; TRIGUEROS, C. Human mesenchymal stromal cells modulate T-cell responses through TNF- α -mediated activation of NF- κ B. **Eur J Immunol**. v. 44(2), p. 480-488, 2014.

ENGLISH, K.; BARRY, F.P.; FIELD-CORBETT, C.P.; MAHON, B.P. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. **Immunol Lett**. v.15,110(2), p. 91-100, 2007.

FRANCHINI, G.; MANN, D.L.; POPOVIC, M.; ZICHT, R.R.; GALLO, R.C.; WONG-STAAAL, F. HTLV-I infection of T and B cells of a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma (ATLL) and transmission of HTLV-I from B cells to normal T cells. **Leuk Res**. v. 9, p.1305–1314, 1985.

FRIEDENSTEIN, A.J.; CHAILAKHJAN, R.K.; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet**. v.3(4), p.393-403, 1970.

FRUMENTO, G.; ROTONDO, R.; TONETTI, M.; DAMONTE, G.; BENATTI, U.; FERRARA, G.B. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. **J Exp Med**. v.19,196(4), p.459-468, 2002.

GALMICHE, M.C.; KOTELIANSKY, V.E.; BRIERE, J.; HERVÉ, P.; CHARBORD, P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. **Blood**. v.82, p. 66 –76, 1993.

GAUDRAY, G.F.; GACHON, J.; BASBOUS, M.; BIARD-PIECHACZYK, C.; DEVAUX, AND MESNARD, J. M.; The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. **Journal of Virology**. v. 76, 24, p. 12813–12822, 2002.

GESSAIN, A.; BARIN, F.; VERNANT, J.C.; GOUT, O.; MAURS, L.; CALENDER, A.; DE THÉ G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**. v. 24, 2(8452), p. 407-10, 1985.

GESSAIN, A.; RUA, R.; BETSEM, E.; TURPIN, J.; MAHIEUX, R. HTLV-3/4 and simian foamy retroviruses in humans: discovery, epidemiology, cross-species transmission and molecular virology. **Virology**. v.5, 435(1), p. 187-199, 2013.

GHEZ, D.; LEPELLETIER, Y.; JONES, K.S.; PIQUE, C.; HERMINE, O. Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. **Retrovirology**. v. 29;7, p.99, 2010.

GHEZ, D.; LEPELLETIER, Y.; LAMBERT, S.; FOURNEAU, J.M.; BLOT, V.; JANVIER, S.; ARNULF, B.; VAN ENDERT, P.M.; HEVEKER, N.; PIQUE, C.; HERMINE, O. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. **J Virol**. v.80(14), p. 6844-6854, 2006.

GIBELLINI, D.; ALVIANO, F.; MISEROCCHI, A.; TAZZARI, P.L.; RICCI, F.; CLÒ, A.; MORINI, S.; BORDERI, M.; VIALE, P.; PASQUINELLI, G.; PAGLIARO, P.; BAGNARA, G.P.; RE, M.C. HIV-1 and recombinant gp120 affect the survival and differentiation of human vessel wall-derived mesenchymal stem cells. **Retrovirology**, v.25; 8, p.40, 2011.

GIBSON, U.E.; HEID, C.A.; WILLIAMS, P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Res**. v.6(10), p. 995-1001, 1996.

GLENNIE, S. I.; SOEIRO, P. J.; DYSON, E.W.; LAM, AND DAZZI, F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. **Blood**. v. 105, 7, p. 2821–2827, 2005.

GRANT, C.; BARMAK, K.; ALEFANTIS, T.; YAO, J.; JACOBSON, S.; WIGDAHL, B. Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. **J Cell Physiol**. v.190(2), p.133-159, 2002.

HAYNESWORTH, S.E.; BABER, M.A.; CAPLAN, AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. **Bone**. v.13, p. 69–80, 1992.

HISHIZAWA, M.; KANDA, J.; UTSUNOMIYA, A.; TANIGUCHI, S.; ETO, T.; MORIUCHI, Y.; TANOSAKI, R.; KAWANO, F.; MIYAZAKI, Y.; MASUDA, M.; NAGAFUJI, K.; HARA, M.; TAKANASHI, M.; KAI, S.; ATSUTAY, SUZUKI, R.; KAWASE, T.; MATSUO, K.; NAGAMURA-INOUE, T.; KATO, S.; SAKAMAKI, H.; MORISHIMA, Y.; OKAMURA, J.; ICHINOHE, T.; UCHIYAMA, T. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. **Blood**. v. 26,116(8), p. 1369-1376, 2010.

HISHIZAWA, M.; IMADA, K.; KITAWAKI, T.; UEDA, M.; KADOWAKI, N.; UCHIYAMA, T. Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals. **Br. J. Haematol**.v. 125, p. 568–575, 2004.

HJELLE, B.; MILLS, R.; GOLDSMITH, C.; SWENSON, S.G.; CYRUS, S. Primary isolation of human T-cell leukemia-lymphoma virus types I and II: use for confirming infection in seroindeterminate blood donors. **J Clin Microbiol**. v.30(8), p.2195-2199, 1992.

HOFSTETTER, C.P.; SCHWARZ, E.J.; HESS, D.; WIDENFALK, J.; EL MANIRA, A.; PROCKOP, D.J.; OLSON, L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.99, p. 2199 –2204, 2002.

HORWITZ, E.M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; DEANS, R.J.; KRAUSE, D.S.; KEATING, A. International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **cytotherapy**.v.7(5), 393-395, 2005.

- IGAKURA, T.; STINCHCOMBE, J.C.; GOON, P.K.; TAYLOR, G.P.; WEBER, J.N.; GRIFFITHS, G.M.; TANAKA, Y.; OSAME, M.; BANGHAM, C.R. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. **Science**. v.299, p.1713-1716, 2003.
- IN 'T ANKER, P.S.; NOORT, W.A.; SCHERJON, S.A.; KLEIJBURG-VAN, D.E.R.; KEUR, C.; KRUISSELBRINK, A.B.; VAN BEZOOIJEN, R.L.; BEEKHUIZEN, W.; WILLEMZE, R.; KANHAI, H.H.; FIBBE, W.E. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. **Haematologica**. v.88(8), p. 845-852, 2003.
- ITOYAMA, Y., MINATO, S.; KIRA, J.; GOTO, I.; SATO, H.; OKOCHI, K.; YAMAMOTO, N. Spontaneous proliferation of peripheral blood lymphocytes increased in patients with HTLV-I-associated myelopathy. **Neurology**. v. 38, 8, p. 1302-1307, 1988.
- JACOBSON, S.; KRICHAVSKY, M.; FLERLAGE, N.; LEVIN, M. Immunopathogenesis of HTLV-I associated neurologic disease: massive latent HTLV-I infection in bone marrow of HAM/TSP patients. **Leukemia**. v. 3, p. 73-5, 1997.
- JAMES, A.W. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic differentiation. **Scientifica (Cairo)**. v.2013, p.684736, 2013.
- JONES, K. S.; PETROW-SADOWSKI, C.; HUANG, Y. K.; BERTOLETTE, D. C.; RUSCETTI, F. W. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. **Nat Med**. v. 14(4), p. 429-36, 2008.
- KALYANARAMAN, V.S.; SARNGADHARAN, M.G.; ROBERT-GUROFF, M.; MIYOSHI, I.; GOLDE D.; GALLO, R.C. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**. v.5,218(4572), p. 571-573, 1982.
- KANNAGI, M.; OHASHI, T.; HARASHIMA, N.; HANABUCHI, S.; HASEGAWA, A.; Immunological risks of adult T-cell leukaemia at primary HTLV-I infection. **Trends Microbiol**. v.12 (7), p.346-352, 2004.
- KARLSSON, H.; SAMARASINGHE, S.; BALL, L.M.; SUNDBERG, B.; LANKESTER, A.C.; DAZZI, F.; UZUNEL, M.; RAO, K.; VEYS, P.; LE BLANC, K.; RINGDÉN, O.; AMROLIA, P.J. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses. **Blood**. v.1,112(3), p. 532-541, 2008.
- KASHANCHI, F.; BRADY, J.N. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. **Oncogene**. v. 24, p. 5938-5951. 2005.
- KAWA, K.; NISHIUCHI, R.; OKAMURA, T.; IGARASHI, H. Eradication of human T-lymphotropic virus type 1 by allogeneic bone-marrow transplantation. **Lancet**. v.26;352(9133), p. 1034-1035, 1998.
- KIKUCHI, H.; OHTSUKA, E.; ONO, K.; NAKAYAMA, T.; SABURI, Y.; TEZONO, K.; OGATA, M.; IWAHASHI, M.; NASU, M. Allogeneic bone marrow transplantation-related transmission of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Bone Marrow Transplant**. v.26(11), p. 1235-1237, 2000.
- KIYOKAWA, T.; YAMAGUCHI, K.; TAKEYA, M.; TAKAHASHI, K.; WATANABE, T.; MATSUMOTO, T.; LEE, SY.; TAKATSUKI, K. Hypercalcemia and osteoclast proliferation in adult T-cell leukemia. **Cancer**. v.59, p.1187-1191, 1987.
- KLOPP, AH.; SPAETH, E.L.; DEMBINSKI, J.L.; WOODWARD, W.A.; MUNSHI, A.; MEYN, R.E.; COX, J.D.; ANDREEFF, M.; MARINI, F.C. Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. **Cancer Res**. v.15,67(24), p.11687-11695, 2007.
- KOYANAGI, Y.; ITOYAMA, Y.; NAKAMURA, N.; TAKAMATSU, K.; KIRA, J.; IWAMASA, T.; GOTO, I.; YAMAMOTO, N. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. **Virology**. v.196(1), p. 25-33, 1993.

KRAMPERA, M.; COSMI, L.; ANGELI, R.; PASINI A.; LIOTTA F.; ANDREINI A.; SANTARLASCI, V.; MAZZINGHI, B.; PIZZOLO, G.; VINANTE, F.; ROMAGNANI, P.; MAGGI, E.; ROMAGNANI S.; ANNUNZIATO, F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Stem Cells**. v. 24, p. 386-398, 2006.

KRAMPERA, M.; GLENNIE, S.; DYSON, J.; SCOTT, D.; LAYLOR, R.; SIMPSON, E.; DAZZI, F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific Tcells to their cognate peptide. **Blood**. v.101, p. 3722–3729, 2003.

LAGRENADE, L.; HANCHARD, B.; FLETCHER, V.; CRANSTON, B.; BLATTNER, W. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **Lancet**.v.336, p.1345-1347, 1990.

LAIRMORE, MD.; ANUPAM, R.; BOWDEN, N.; HAINES, R.; HAYNES, R.A.; RATNER, L.; GREEN, P.L. Molecular determinants of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and spread. **Viruses**. v. 3(7), p.1131-1165, 2011.

LARGHERO, J.; FARGE, D.; BRACCINI, A.; LECOURT, S.; SCHERBERICH, A.; FOÏS, E.; VERRECCHIA, F.; DAIKELER, T.; GLUCKMAN, E.; TYNDALL, A.; BOCELLI-TYNDALL, C. Phenotypical and functional characteristics of in vitro expanded bone marrow mesenchymal stem cells from patients with systemic sclerosis. **Ann Rheum Dis**. v.67(4), p. 443-449, 2008.

LE BLANC, K.; GÖTHERSTRÖM, C.; RINGDÉN, O.; HASSAN, M.; MCMAHON, R.; HORWITZ, E.; ANNEREN, G.; AXELSSON, O.; NUNN, J.; EWALD, U.; NORDÉN-LINDEBERG, S.; JANSSON, M.; DALTON, A.; ASTRÖM, E.; WESTGREN, M. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. **Transplantation**. v. 15,79(11), 1607-1614, 2005.

LE BLANC, K.; MOUGIAKAKOS, D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. **Nat Rev Immunol**. v. 25,12(5), p. 383-396, 2012.

LE BLANC, K.; TAMMIK, C.; ROSENDAHL, K.; ZETTERBERG, E.; RINGDÉN, O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. **Exp Hematol**. v. 31(10), 890-896, 2003.

LE BLANC, K.; TAMMIK, L.; SUNDBERG, B.; HAYNESWORTH, SE.; RINGDÉN, O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. **Scand J Immunol**. v.57, p.11–20, 2003.

LE BLANC, K.; AND RINGDEN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. **J. Intern.Med**. v. 262, p. 509–525, 2007.

LEVIN, M.C.; KRICHAVSKY, M.; FOX, R.J.; LEHKY, T.; JACOBSON, S.; FOX, C.; KLEGHORN, F.; WHITE, J.; YOUNG, N.; EDWARDS, R.J.; JACK, N.E.; BARTHOLOMEW, C. Extensive latent retroviral infection in bone marrow of patients with HTLV-I-associated neurologic disease. **Blood**., v. 1;89(1), p. 346-8, 1997.

LIOTTA, F.; ANGELI, R.; COSMI, L.; FILÌ, L.; MANUELLI, C.; FROSALI, F.; MAZZINGHI, B.; MAGGI, L.; PASINI, A.; LISI, V.; SANTARLASCI, V.; CONSOLONI, L.; ANGELOTTI, ML.; ROMAGNANI, P.; PARRONCHI, P.; KRAMPERA, M.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; ANNUNZIATO, F. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. **Stem Cells**. v.26(1), p. 279-289, 2008.

LIOTTA, F.; ANGELI, R.; COSMI, L.; FILÌ, L.; MANUELLI, C.; FROSALI, F.; MAZZINGHI, B.; MAGGI L.; PASINI, A.; LISI, V.; SANTARLASCI, V.; CONSOLONI, L.; ANGELOTTI, M.L.; ROMAGNANI, P.; PARRONCHI, P.; KRAMPERA, M.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; ANNUNZIATO, F. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. **Stem Cells**. v. 26(1), p.279-289, 2007.

- LO, K.M.; VIVIER, E.; ROCHET, N.; DEHNI, G.; LEVINE, H.; HASELTINE, W.A.; ANDERSON, P. Infection of human natural killer (NK) cells with replication-defective human T cell leukemia virus type I provirus. Increased proliferative capacity and prolonged survival of functionally competent NK cells. **J. Immunol.** v. 149, p. 4101–4108, 1992.
- LUCCHINI, G.; DANDER, E.; PAVAN, F.; DI Ceglie, I.; BALDUZZI, A.; PERSEGHIN, P.; GAIPA, G.; ALGAROTTI, A.; INTRONA, M.; RAMBALDI, A.; ROVELLI, A.; BIONDI, A.; BIAGI, E.; D'AMICO, G. Mesenchymal stromal cells do not increase the risk of viral reactivation nor the severity of viral events in recipients of allogeneic stem cell transplantation. **Stem Cells Int.** v.2012, p.690236, 2012.
- MA, R.; XING, Q.; SHAO, L.; WANG, D.; HAO, Q.; LI, X.; SAI, L.; MA, L. Hepatitis B virus infection and replication in human bone marrow mesenchymal stem cells. **Viral J.** v. 31;8, p. 486, 2011.
- MACATONIA, S.E.; CRUICKSHANK, J.K.; RUDGE, P.; KNIGHT, S.C. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. **AIDS Res. Hum. Retroviruses.** v. 8, p. 1699–1706, 1992.
- MALTA, T.M.; SILVA, I.T.; PINHEIRO, D.G.; SANTOS, A.R.; PINTO, M.T.; PANEPUCCI, R.A.; TAKAYANAGUI, O.M.; TANAKA, Y.; COVAS, D.T.; KASHIMA S. Altered expression of degranulation-related genes in CD8+ T cells in human T lymphotropic virus type I infection. **AIDS Res Hum Retroviruses.** v.29(5), p. 826-836, 2013.
- MANEL, N.; KIM, F.J.; KINET, S.; TAYLOR, N.; SITBON, M.; BATTINI, J.L. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. **Cell.** v.14,115(4), p. 449-459, 2003.
- MATSUOKA, M.; JEANG, K.T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nat Rev Cancer.** v.7(4), p. 270-280, 2007.
- MEISEL, R.; HESELER, K.; NAU, J.; SCHMIDT, S.K.; LEINWEBER, M.; PUDELKO, S.; WENNING, J.; ZIMMERMANN, A.; HENGEL, H.; SINZGER, C.; DEGISTIRICI, Ö.; SORG, R.V.; DÄUBENER, W. Cytomegalovirus infection impairs immunosuppressive and antimicrobial effector functions of human multipotent mesenchymal stromal cells. **Mediators Inflamm.** v. 2014, p. 898630, 2014.
- MEISEL, R.; ZIBERT, A.; LARYEA, M.; GÖBEL, U.; DÄUBENER, W.; DILLOO, D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. **Blood.** v.15;103(12), p. 4619-4621, 2004.
- MIYOSHI, I.; KUBONISHI, I.; YOSHIMOTO, S.; SHIRAISHI, Y. A T-cell line derived from normal human cord leukocytes by co-culturing with human leukemic T-cells. **Gann.** v.72(6), p. 978-981, 1981.
- MORCHANG, A.; PANAAMPON, J.; SUTTITHEPTUMRONG, A.; YASAMUT, U.; NOISAKRAN, S.; YENCHITSOMANUS, P.T.; LIMJINDAPORN, T. Role of cathepsin B in dengue virus-mediated apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 16,438(1), p. 20-25, 2013.
- MOSLEY, A.J.; ASQUITH, B.; BANGHAM, C.R. Cell-mediated immune response to human T-lymphotropic virus type I. **Viral Immunol.** v.18(2), p. 293-305, 2005.
- NAGAFUJI, K.; HARADA, M.; TESHIMA, T.; ETO, T.; TAKAMATSU, Y.; OKAMURA, T.; MURAKAWA, M.; AKASHI, K.; NIHO, Y. Hematopoietic progenitor cells from patients with adult T-cell leukemia-lymphoma are not infected with human T-cell leukemia virus type 1. **Blood.** v.1,82(9), p. 2823-2828, 1993.
- NAGAI, K.; JINNAI, I.; HATA, T.; USUI, T.; SASAKI, D.; TSUKASAKI, K.; SUGAHARA, K.; HISHIKAWA, Y.; YAMADA, Y.; TANAKA, Y.; KOJI, T.; MANO, H.; KAMIHIRA, S.; TOMONAGA, M. Adhesion-dependent growth of primary adult T cell leukemia cells with down-regulation of HTLV-I p40Tax protein: a novel in vitro model of the growth of acute ATL cells. **Int J Hematol.** v.88(5), p.551-564, 2008.

- NAKAGAWA, M.; IZUMO, S.; IJICHI, S.; KUBOTA, H.; ARIMURA, K.; KAWABATA, M.; OSAME, M. HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. **Journal of Neurovirology**. vol. 1, 1, p. 50–61, 1995.
- NEAL, TF.; HOLLAND, HK.; BAUM, CM.; VILLINGER, F.; ANSARI, AA.; SARAL, R.; WINGARD, JR.; FLEMING, W.H. CD34⁺ progenitor cells from asymptomatic patients are not a major reservoir for human immunodeficiency virus-1. **Blood**. v.1;86(5), p. 1749-1756, 1995.
- NEVE, A. A.; CORRADO, A.N.D.; CANTATORE, F. P. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. **Cell and Tissue Research**. v. 343, 2, p. 289–302, 2011.
- NISHIOKA K, MARUYAMA I, SATO K, KITAJIMA I, NAKAJIMA Y, OSAME M. Chronicinflammatory arthropathy associated with HTLV-I. **Lancet**. 1989 Feb 25;1(8635):441.
- OPITZ, CA.; LITZENBURGER, U.M.; LUTZ, C.; LANZ, TV.; TRITSCHLER, I.; KÖPPEL, A.; TOLOSA, E.; HOBERG, M.; ANDERL, J.; AICHER, W.K.; WELLER, M.; WICK, W.; PLATTEN, M. Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. **Stem Cells**. v.27(4), p. 909-919, 2009.
- OSAME, M.; NAKAGAWA, M.; UMEHARA, F.; IJICHI, S.; MORITOYO, T.; HIGUCHI, I.; USUKU, K.; ARIMURA, K.; IZUMO, S. Recent studies on the epidemiology.; clinical features and pathogenic mechanisms of HTLV-I associated myelopathy (HAM/TSP) and other diseases associated to HTLV. **J Neurovirol**. v.3 Suppl 1:S50-1, 1997.
- OSAME, M.; USUKU, K.; IZUMO, S.; IJICHI, N.; AMITANI, H.; IGATA, A.; MATSUMOTO, M.; TARA, M. HTLV-I associated myelopathy,a new clinical entity. **Lancet**. v. 3,1(Suppl8488), p.1031-1032, 1986.
- OWEN, M.; FRIEDENSTEIN, A.J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. **Ciba Found Symp**.v.136, p. 42-60, 1988.
- PARSONS CH.; SZOMJU B.; KEDES DH. Susceptibility of human fetal mesenchymal stem cells to Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. **Blood**. 2004 Nov 1;104(9):2736-8.
- PINTO, M.T.; MALTA, T.M.; RODRIGUES, E.S.; PINHEIRO, D.G.; PANEPUCCI, R.A.; MALMEGRIM, DE FARIAS, K.C.; SOUSA, A.D.E.P.; TAKAYANAGUI, O.M.; TANAKA, Y.; COVAS, D.T.; KASHIMA, S. Genes Related to Antiviral Activity.; Cell Migration.; and Lysis Are Differentially Expressed in CD4(+) T Cells in Human T Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis Patients. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v.30(6), p. 610-622, 2014.
- PINTO, M.T.; RODRIGUES, E.S.; MALTA, T.M.; MALTA, T.M, AZEVEDO, R, TAKAYANAGUI, O.M, VALENTE, V.B, UBIALI, E.M, COVAS, D.T, KASHIMA, S. HTLV-1/2 seroprevalence and coinfection rate in Brazilian first-time blood donors: an 11-year follow-up. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**.v.54, p.123-129, 2012.
- PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.;SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**. v. 2,284(5411), p.:143-147, 1999.
- POIESZ, B.J.; RUSCETTI, F.W.; GAZDAR, A.F.; BUNN, P.A.; MINNA, J.D.; GALLO, R.C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 77(12), p. 7415-7419, 1980.
- PROCKOP, D.J. Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. **Stem Cells**. v.31(10), p. 2042-2046, 2013.

- REN, G.; ZHANG, L.; ZHAO, X.; XU, G.; ZHANG, Y.; ROBERTS, A.I.; ZHAO, R.C.; SHI, Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. **Cell Stem Cell**. v.7;2(2), p.141-150, 2008.
- REN, G.; ZHAO, X.; ZHANG, L.; ZHANG, J.; L'HUILLIER, A.; LING, W.; ROBERTS, A.I.; LE, A.D.; SHI, S.; SHAO, C.; SHI, Y. Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. **J Immunol**. v.1;184(5), 2321-2328, 2010.
- RICHARDSON, J.H.; EDWARDS, A.J.; CRUICKSHANK, J.K.; RUDGE, P.; DALGLEISH, A.G. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. **J. Virol**. v. 64, p. 5682–5687, 1990.
- RIVERA, LE.; COLON, K.; CANTRES-ROSARIO, Y.M.; ZENON, F.M.; MELENDEZ, L.M. Macrophage Derived Cystatin B / Cathepsin B in HIV Replication and Neuropathogenesis. **Curr HIV Res**. v. 26. 11 Suppl 3, p. 582-584, 2014.
- ROCHA-JUNIOR.; M.C. Desenvolvimento de uma plataforma molecular para detecção do HTLV-1 e HTLV-2. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2014.
- ROLLÍN, R.; ALVAREZ-LAFUENTE, R.; MARCO, F.; JOVER, J.A.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, C.; RODRÍGUEZ-NAVAS, C.; LÓPEZ-DURÁN, L.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, B. Human parvovirus B19, varicella zoster virus, and human herpesvirus-6 in mesenchymal stem cells of patients with osteoarthritis: analysis with quantitative real-time polymerase. **Osteoarthritis Cartilage**. v.15(4), p. 475-478, 2007.
- ROMIEU-MOUREZ, R.; FRANÇOIS, M.; BOIVIN, M.N.; STAGG, J.; GALIPEAU, J. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. **J Immunol**.v.179, p.1549-1558, 2007.
- RONG, Q.; ZHANG, L.; SU, E.; LI, J.; LI, J.; LIU, Z.; HUANG, Z.; MA, W.; CAO, K.; HUANG, J. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells are capable of mediating hepatitis B virus infection in injured tissues. **J Viral Hepat**. v.15(8), p. 607-614, 2008.
- ROSEN, E. D.; MACDOUGALD, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 7, 12, p. 885–896, 2006.
- SAKATA, D.; YAO, C.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E2, an immunoactivator. **Journal of Pharmacological Sciences**. vol. 112,1, p. 1–5, 2010.
- SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R.W.; BROWN, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**. v. 20,270(5235), p. 467-470, 1995.
- SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. **Blood Cells**.v. 4(1-2), p.7-25, 1978.
- SELMANI, Z.; NAJI, A.; GAIFFE, E.; OBERT, L.; TIBERGHEN, P.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E.D.; DESCHASEAUX, F. HLA-G is a crucial immunosuppressive molecule secreted by adult human mesenchymal stem cells. **Transplantation**. v.15;87(9Suppl):S62-6, 2009.
- SHALON, D.; SMITH, S.J.; BROWN, P.O. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. **Genome Res**. v.6(7), p. 639-645, 1996.
- SHIRATORI, S.; YASUMOTO, A.; TANAKA, J.; SHIGEMATSU, A.; YAMAMOTO, S.; NISHIO, M.; HASHINO, S.; MORITA, R.; TAKAHATA, M.; ONOZAWA, M.; KAHATA, K.; KONDO, T.; OTA, S.; WAKASA, K.; SUGITA, J.; KOIKE, T.; ASAKA, M.; KASAI, M.; IMAMURA, M. A retrospective analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T cell leukemia/lymphoma (ATL): clinical impact of graft-versus-leukemia/ lymphoma effect. **Biol Blood Marrow Transplant**. v.14(7), p.817-823, 2008.

- SMIRNOV, SV.; HARBACHEUSKI, R.; LEWIS-ANTES, A.; ZHU, H.; RAMESHWAR, P.; KOTENKO, S.V. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells as a target for cytomegalovirus infection: implications for hematopoiesis.; self-renewal and differentiation potential. **Virology**. v.30,360(Suppl1), p.6-16, 2007.
- SÖDERBERG, C.; GIUGNI, T.D.; ZAIA, J.A.; LARSSON, S.; WAHLBERG, J.M.; MÖLLER, E. CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection. **J Virol**. v. 67(11), p. 6576-6585, 1993.
- SORDI, V.; MALOSIO, M.L.; MARCHESI, F.; MERCALLI, A.; MELZI, R.; GIORDANO, T.; BELMONTE, N.; FERRARI, G.; LEONE, B.E.; BERTUZZI, F.; ZERBINI, G.; ALLAVENA, P.; BONIFACIO, E.; PIEMONTE, L. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. **Blood**. v. 15,106(2), p. 419-427, 2005.
- STAGG, J.; POMMEY, S.; ELIOPOULOS, N.; GALIPEAU, J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. **Blood**.v.107, p. 2570-2577, 2006.
- STARLING, A.L.; MARTINS-FILHO, O.A.; LAMBERTUCCI, J.R.; LABANCA, L.; DE SOUZA, PEREIRA, S.R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS, M.L.; RIBAS, J.G.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; GONÇALVES, D.U. Proviral load and the balance of serum cytokines in HTLV-1-asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Acta Trop**. v.125(1), p.75-81, 2013.
- SUNDIN, M.; LINDBLOM, A.; ORVELL, C.; BARRETT, A.J.; SUNDBERG, B.; WATZ, E.; WIKMAN, A.; BROLIDEN, K.; LE BLANC, K. Persistence of human parvovirus B19 in multipotent mesenchymal stromal cells expressing the erythrocyte P antigen: implications for transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**. v.14(10), p.1172-1179, 2008.
- SUNDIN, M.; ORVELL, C.; RASMUSSEN, I.; SUNDBERG, B.; RINGDÉN, O.; LE BLANC, K. Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses.; but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. *Bone Marrow Transplant*.v.37(11), p.1051-1059, 2006.
- TAKATSUKI, K. Adult T-cell leukemia: concept and problems (author's transl). **Rinsho Ketsueki**. v.20(9), p.1036-1039, 1979.
- TAMAI, Y.; HASEGAWA, A.; TAKAMORI, A.; SASADA, A.; TANOSAKI, R.; CHOI, I.; UTSUNOMIYA, A.; MAEDA, Y.; YAMANO, Y.; ETO, T.; KOH, K.R.; NAKAMAE, H.; SUEHIRO, Y.; KATO, K.; TAKEMOTO, S.; OKAMURA, J.; UIKE, N.; KANNAGI, M. Potential contribution of a novel Tax epitope-specific CD4+ T cells to graft-versus-Tax effect in adult T cell leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **J Immunol**. v.15,190(8), p.4382-4392, 2013.
- TANG, SW.; CHEN, C.Y.; KLASE, Z.; ZANE, L.; JEANG, K.T. The cellular autophagy pathway modulates human T-cell leukemia virus type 1 replication. **J Virol**. v.87(3), p.1699-1707, 2013.
- TENDLER, C.L.; GREENBERG, S.J.; BURTON, J.D.; DANIELPOUR, D.; KIM, S.J.; BLATTNER, WA.; MANNS, A.; WALDMANN, T.A. Cytokine induction in HTLV-I associated myelopathy and adult T-cell leukemia: alternate molecular mechanisms underlying retroviral pathogenesis. **J Cell Biochem**. v.46(4), p. 302-311, 1991.
- TOMCHUCK, S.L.; ZWEZDARYK, K.J.; COFFELT, S.B.; WATERMAN, R.S.; DANKA, E.S.; SCANDURRO, A.B. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. **Stem Cells**. v.26(1), p.99-107, 2008.
- TRENTO, C.; DAZZI, F. Mesenchymal stem cells and innate tolerance: biology and clinical applications. **Swiss Med Wkly**. v. 26,140, p13121, 2010.
- TSE, W. T.; PENDLETON, J. D.; BEYER, W. M.; EGALKA, M. C.; & GUINAN, E. C. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. **Transplantation**. v. 75, p. 389-397, 2003.

TYNDALL, A. Application of autologous stem cell transplantation in various adult and pediatric rheumatic diseases. **Pediatr Res.** v.71(4 Pt 2), p.433-438, 2012.

UCHIYAMA, T. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. **Annu Rev Immunol.** v.15, p.15-37, 1997.

UMEHARA, F.; IZUMO, S.; RONQUILLO, A.T.; MATSUMURO, K.; SATO, E.; OSAME, M. Cytokine expression in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. **J Neuropathol Exp Neurol.** v.53(1), p.72-77, 1994.

WANG, L.; MONDAL, D.; LA RUSSA, V.F.; AGRAWAL, K.C. Suppression of clonogenic potential of human bone marrow mesenchymal stem cells by HIV type 1: putative role of HIV type 1 tat protein and inflammatory cytokines. **AIDS Res Hum Retroviruses.** v.1;18(Suppl13), p.917-931, 2002.

WATANABE, T.; MOCHIZUKI, M.; YAMAGUCHI, K. HTLV-1 uveitis (HU). **Leukemia.** v. 3, p. 582-584, 1997.

WATERMAN, R.S.; TOMCHUCK, S.L.; HENKLE, S.L.; BETANCOURT, A.M. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. **PLoS One.** v.5(4), p. 10088, 2010.

WEI, G.; LIN, M.; CAI, Z.; HUANG, H. Cytomegalovirus infection in mesenchymal stem cells and their activation could be enhanced by nuclear factor- κ B inhibitor pyrrolidinedithiocarbamate in vitro. **Transplant Proc.** v. 43(Suppl5), p.1944-1949, 2011.

WOLFE, N.D.; HENEINE, W.; CARR, J.K.; GARCIA, A.D.; SHANMUGAM, V.; TAMOUFE, U.; TORIMIRO, J.N.; PROSSER, A.T.; LEBRETON, M.; MPOUDI-NGOLE, E.; MCCUTCHAN, FE.; BIRX, D.L.; FOLKS, T.M.; BURKE, D.S.; SWITZER, W.M. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 31;102(22), p. 7994-7999, 2005.

XIAN, C.J.; FOSTER, B.K. Repair of injured articular and growth plate cartilage using mesenchymal stem cells and chondrogenic gene therapy. **Curr Stem Cell Res Ther.** v.1(2), p.213-229, 2006.

YAMOUT, B.; HOURANI, R.; SALTI, H.; BARADA, W.; EL-HAJJ, T.; AL-KUTOUBI, A.; HERLOPIAN, A.; BAZ, E.K.; MAHFOUZ, R.; KHALIL-HAMDAN, R.; KREIDIEH, N.M.; EL-SABBAN, M.; BAZARBACHI, A. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study. **J Neuroimmunol.** v.8,227(1-2), p. 185-189, 2010.

YOSHIDA, M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. **Annu Rev Immunol.** v.19, p.475-496, 2001.

YU, G.; WU, X.; DIETRICH, M.A.; POLK, P.; SCOTT, L.K.; PTITSYN, A.A.; GIMBLE, J.M. Yield and characterization of subcutaneous human adipose-derived stem cells by flow cytometric and adipogenic mRNA analyzes. **Cytothchain reaction. Osteoarthritis Cartilage.** v.15(4), p.475-478, 2007.

VIII. APÊNDICE

Apêndice 1. Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo das MSC isoladas da medula óssea de indivíduos saudáveis.

Marcadores	MSC				Média da % de células ⁺
	MO61	MO62	MO63	MO64	
CD14⁺	0,12	0,69	3,02	0,14	0,99
CD45⁺	0,24	1,17	2,86	0,23	1,13
CD54⁺	37,07	47,12	29,92	35,27	37,35
CD51⁺/61⁺	2,42	3,96	2,7	0,54	2,41
CD44⁺	95,68	93,59	97,35	96,88	95,88
CD29⁺	79,23	81,32	89,6	99,14	87,32
HLA-DR⁺	5,91	2,72	5,12	2,3	4,01
ABC⁺	27,6	56,83	83,19	92,17	64,95
CD106⁺	2,62	4,84	3,06	7,31	4,46
CD73⁺	91,99	80,19	94,52	96,43	90,78
CD105⁺	90,98	82,04	93,24	96,32	90,65
CD166⁺	74,19	65,78	87,52	92,56	80,01
CD146⁺	55,09	74,65	83,16	78,9	72,95
CD31⁺	0,49	1,43	1,03	0,63	0,90
CD49e⁺	93,58	92,48	93,72	94,51	93,57
CD34⁺	0,33	0,7	0,17	0,18	0,35
CD13⁺	97,93	98,83	97,95	99,64	98,59
CD90⁺	97,93	97,82	98,04	99,09	98,22

Apêndice 2. Características das amostras de células mononucleares de sangue periférico (PBMNC) isoladas de indivíduos saudáveis e de indivíduos HTLV-1⁺ que foram utilizadas nos ensaios de linfoproliferação.

<i>Diagnóstico</i>	<i>Sexo</i>	<i>Idade</i>	<i>CD4⁺</i>	<i>CD8⁺</i>	<i>Razão CD4/CD8</i>	<i>HTLV-1 CPV (cópias/10⁵ células)</i>	<i>HTLV-1 CPV Log 10 (cópias/10⁵ células)</i>
HAM /TSP 02	F	39	1906	423	4,51	4780,76	3,68
HAM/TSP 07	F	58	1050	365	2,88	9388,30	3,97
HAM/TSP 10	F	66	1084	237	4,57	6265,49	3,80
HAM /TSP 11	M	52	2057	1864	1,10	ND	ND
HAM/TSP 14	F	64	1120	617	1,82	116907,95	5,07
HAM/TSP 20	M	63	1038	371	2,80	ND	ND
HAM /TSP 25	M	52	786	327	2,40	10508,22	4,02
HAM/TSP 28	M	60	ND	ND	ND	ND	ND
HAM /TSP 29	F	56	ND	ND	ND	ND	ND
HAM /TSP 30	F	21	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Média</i>		<i>53,1</i>	<i>1291,57</i>	<i>600,57</i>	<i>2,87</i>	<i>29570,14</i>	<i>4,11</i>
HAC 05	M	31	432	252	1,71	1336,81	3,13
HAC 06	M	42	1223	575	2,13	667,89	2,82
HAC 08	F	31	1251	760	1,65	5768,47	3,76
HAC 20	M	49	775	205	3,78	2290,48	3,36
HAC 30	F	54	1686	467	3,61	5806,28	3,76
HAC 32	M	52	1701	644	2,64	ND	ND
HAC 34	F	34	ND	ND	ND	ND	ND
HAC 35	M	39	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Média</i>		<i>41,5</i>	<i>1178</i>	<i>483,83</i>	<i>2,59</i>	<i>3173,99</i>	<i>3,37</i>
CT 15	F	33	776	729	1,06	-	-
CT 43	M	36	1448	890	1,63	-	-
CT 45	F	55	1055	633	1,67	-	-
CT 47	M	42	ND	ND	ND	-	-
CT 48	F	24	ND	ND	ND	-	-
<i>Média</i>		<i>38</i>	<i>1093</i>	<i>750,67</i>	<i>1,45</i>		

*F=feminino; M= masculino; CT= indivíduo controle; HAC= portador assintomático do HTLV-1; HAM/TSP= indivíduo com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1; CPV= carga proviral; ND= não determinado.

Apêndice 3. Efeito da exposição de MSC ao HTLV-1 na expressão de moléculas de superfície por citometria de fluxo. A) HLA- ABC; B) CD73; C) CD105; D) CD45.

RT-PCR quantitativo dos genes (E) ICAM-1, (F) VCAM-1 e (G) CD271. MSC isoladas da medula óssea (MO) e cultivadas em condições controle (MSC), MSC cultivadas com células MT2 utilizando um sistema transwell (MSC+trans), MSC cultivadas na presença de partículas virais do HTLV-1 (MSC+vírus), MSC cultivadas na presença de células MT2 irradiadas (MSC+MT2). Os resultados são representados como a média $\pm$ SEM e foram obtidos por pelo menos três experimentos independentes. Foi utilizado um teste t Mann – Whitney e os asteriscos denotam diferenças significativas em relação ao controle (* $p \leq 0,05$). Perfil imunofenotípico das MSCs co-cultivadas com PBMCs de indivíduos infectados pelo HTLV-1 sintomáticos (paraparesia espástica tropical /mielopatia associada ao HTLV; HAM/TSP), portadores assintomáticos (HAC) e indivíduos saudáveis (controle) utilizando um sistema transwell. Os dados são apresentados como médias $\pm$ SEM da percentagem de células coradas com (H) anti-CD54 e (I) anti-CD271 e avaliados por citometria de fluxo. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes e foi utilizado *Mann-Whitney*. * $p < 0,05$ em comparação com indivíduos saudáveis (controle).

Apêndice 4. Características das amostras de PBMC isoladas de indivíduos saudáveis e de indivíduos HTLV-1⁺ que foram utilizadas nos ensaios de co-cultivo com MSC.

Amostra	Sexo	Idade	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Razão CD4/CD8	Gate % CD4	Invertida % CD4	CPV /10 ⁵ células	CPV (Log 10)
CT 14	M	28	1178	273	4,32	98,60	95,23	-	-
CT 33	F	22	1500	950	1,58	97,36	96,57	-	-
CT 35	F	51	773	280	2,76	99,49	96,69	-	-
CT 36	F	55	943	346	2,73	83,33	87,56	-	-
CT 37	F	60	743	748	0,99	91,47	92,56	-	-
CT 39	F	43	1548	445	3,48	98,28	95,86	-	-
CT 41	F	54	802	260	2,06	99,24	96,57	-	-
<i>Média</i>		<i>44,71</i>	<i>1069,57</i>	<i>438,29</i>	<i>2,56</i>	<i>95,40</i>	<i>94,43</i>		
HAC 01	F	52	1224	697	1,76	93,29	93,98	2300,4	3,36
HAC 13	F	42	750	552	1,36	97,00	92,39	6460,4	3,81
HAC 20	M	45	720	369	1,95	98,70	93,83	ND	ND
HAC 22	M	61	766	357	2,14	99,07	96,12	1233,1	3,09
HAC 24	F	61	984	677	1,45	98,69	97,60	ND	ND
HAC 27	M	36	1452	901	1,61	96,58	96,84	650,7	2,81
HAC 28	F	27	1477	904	1,63	99,28	97,53	309,6	2,49
<i>Média</i>		<i>46,29</i>	<i>1053,29</i>	<i>636,71</i>	<i>1,70</i>	<i>97,52</i>	<i>95,47</i>	<i>2190,86</i>	<i>3,11</i>
HAM/TSP 02	F	34	1025	239	4,29	94,84	97,02	ND	ND
HAM/TSP 05	F	61	2497	1001	2,49	96,59	92,36	4780,8	3,68
HAM/TSP 11	M	45	1267	1182	1,07	86,42	95,86	1734,1	3,24
HAM/TSP 12	F	51	1608	887	1,81	98,90	95,23	8881,1	3,95
HAM/TSP 14	F	61	665	256	2,60	97,31	93,82	11130,5	4,05
HAM/TSP 21	F	57	876	570	1,54	99,52	97,50	9548,5	3,98
<i>Média</i>		<i>51,5</i>	<i>1323</i>	<i>689,17</i>	<i>2,3</i>	<i>95,60</i>	<i>95,30</i>	<i>7214,99</i>	<i>3,78</i>

*F=femimino; M= masculino; CT= indivíduo controle; HAC= portador assintomático do HTLV-1; HAM/TSP= indivíduo com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1; CPV= carga proviral; ND= não determinado.

Apêndice 5. Análise por PCR em tempo real da curva de *melting* gerada após amplificação dos genes GAPDH, ACTB, GLUT-1, HSPG, NRP1 e PPARG pela metodologia de *Syber Green*. Todos os genes apresentam um único pico, indicando especificidade da reação de PCR em tempo real.

Apêndice 6. Caracterização das amostras de medula óssea obtidas de indivíduos saudáveis e indivíduos HTLV-1+.

Identificação da amostra	Idade	Sexo	Hemoglobina (g/dl)	CD34 ⁺ mm ³	CD45 ⁺ / CD14 ⁺	CD3 ⁺ / CD19 ⁺	CD3 ⁺ / CD8 ⁺	CD3 ⁺ / CD4 ⁺	CD73 ⁺ / CD105 ⁺	HTLV CPV (cópias/10 ⁵ células)
MO Controle 01	ND	M	10,8	112,06	1,40	0,04	2,91	5,12	0,10	-
MO Controle 02	24	F	8,90	156,96	1,32	0,13	11,81	18,58	0,16	-
MO Controle 03	39	F	10,0	103,30	2,27	0,00	3,98	5,42	0,43	-
<i>Média</i>	<i>31,5</i>		<i>9,9</i>	<i>124,11</i>	<i>1,66</i>	<i>0,06</i>	<i>6,23</i>	<i>9,71</i>	<i>0,23</i>	
MO HTLV-1 HAC 22	66	M	11,1	22,9	0,60	0,35	1,72	3,78	0,54	392,04
MO HTLV-1 HAC 25	75	M	15,9	7,07	1,08	0,14	17,05	35,79	0,48	281,13
MO HTLV-1 HAC 33	51	M	18,9	426,9	6,85	0,91	19,5	35,55	0,51	1095,39
<i>Média</i>	<i>64</i>		<i>15,3</i>	<i>152,29</i>	<i>2,84</i>	<i>0,47</i>	<i>12,76</i>	<i>25,04</i>	<i>0,51</i>	<i>589,52</i>
MO HTLV-1 HAM/TSP 01	61	F	15,4	85,54	2,66	1,34	22,9	20,39	1,00	23439,86
MO HTLV-1 HAM/TSP 16	58	M	13,2	37,01	2,11	1,60	26,34	39,17	1,10	7695,74
MO HTLV-1 HAM/TSP 28	59	M	13,1	16,62	4,61	0,41	7,59	32,10	0,51	1222,74
<i>Média</i>	<i>59</i>		<i>13,9</i>	<i>46,4</i>	<i>3,1</i>	<i>1,1</i>	<i>18,9</i>	<i>30,6</i>	<i>0,90</i>	<i>10786,11</i>

*F=feminino; M= masculino; CT= indivíduo controle; HAC= portador assintomático do HTLV-1; HAM/TSP= indivíduo com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1; CPV= carga proviral; ND= não determinado.

Apêndice 7. Caracterização das amostras de MSC de medula óssea obtidas de indivíduos saudáveis e indivíduos HTLV-1⁺.

	CD49e ⁺	CD31 ⁺	CD166 ⁺	CD13 ⁺	CD90 ⁺	CD14 ⁺	CD45 ⁺	CD51 ⁺ / 61 ⁺	CD54 ⁺	CD44 ⁺	CD146 ⁺	CD29 ⁺	HLA- DR ⁺	HLA ABC ⁺	CD34 ⁺	CD73 ⁺	CD106 ⁺	CD105 ⁺
MSC Controle 01	89,07	0,07	80,11	98,45	95,77	0,04	0,00	6,69	56,74	67,01	29,16	98,41	0,54	51,88	1,47	69,50	7,71	90,00
MSC Controle 02	94,46	0,22	90,62	99,21	95,42	0,00	0,03	3,5	53,56	81,45	56,49	96,33	3,85	84,04	4,73	94,00	9,69	88,93
MSC Controle 03	37,93	0,31	45,06	88,5	78,63	1,07	0,39	0,55	19,96	62,32	18,47	88,30	0,01	-	2,66	57,70	0,29	41,05
Média	73,82	0,20	71,93	95,39	89,94	0,37	0,14	3,58	43,42	70,26	34,71	94,35	1,47	67,96	2,95	73,73	5,90	73,33
MSC MO HAC 22	78,46	1,79	80	94,77	93,13	0,00	0,89	6,13	48,7	75,06	54,84	95,39	5,21	77,82	0,05	88,50	4,27	82,65
MSC MO HAC 33	64,05	0,68	65,96	90,86	84,29	0,24	0,76	3,79	25,17	75,59	44,95	89,01	19,96	67,46	0,00	86,62	0,59	80,65
MSC MO HAC 25	85,72	0,21	27,58	-	98,59	0,00	0,06	-	12,51	80,56	31,34	98,94	0,22	79,27	5,08	96,29	2,10	96,98
Média	76,08	0,89	57,85	92,82	92,00	0,08	0,57	4,96	28,79	77,07	43,71	94,45	8,46	74,85	1,71	90,47	2,32	86,76
MSC MO HAM/TSP 01	69,2	0,19	73,38	95,71	89,35	0,52	0,02	2,49	34,43	76,51	65,48	95,15	0,53	72,58	0,00	84,46	1,89	86,66
MSC MO HAM/TSP 16	88,07	1,92	79,5	97,33	96,09	0,00	0,18	5,03	48,99	83,11	38,45	97,88	3,35	61,06	0,00	93,89	4,24	91,45
MSC MO HAM/TSP 28	72,96	0,00	10,81	-	89,86	0,00	0,00	-	33,07	68,78	32,81	88,03	12,74	43,07	0,45	77,34	2,68	74,25
Média	76,74	0,70	54,56	96,52	91,77	0,17	0,07	3,76	38,83	76,13	45,58	93,69	5,54	58,90	0,15	85,23	2,94	84,12

CT= indivíduo controle; HAC= portador assintomático do HTLV-1; HAM/TSP= indivíduo com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1.

IX. ANEXOS

1. Aceite do Comitê de Ética

Mem. nº 840/2011
GS-3.3/SMFK

Ribeirão Preto, 28 de junho de 2011

Ilustríssima Senhora
EVANDRA STRAZZA RODRIGUES SANDOVAL
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

Prezada Senhora,

Atendendo solicitação da Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP, Dr^a Marcia Guimarães Villanova, encaminho a Vossa Senhoria Parecer nº 374/2011, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado **“AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS HUMANAS EM LINFÓCITOS T INFECTADOS PELO HTLV-1”**, de acordo com o Processo HCRP nº 12462/2010.

O parecer informa que seu projeto encontra-se **APROVADO**.
Atenciosamente.

SUSI MARA FURIAMA KATO
Diretora do Serviço de Comunicações
Administrativas
R.F. nº 7882

2. Termo de Consentimento aprovado para coleta de sangue periférico

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA:

“Avaliação do efeito imunomodulador das células mesenquimais estromais humanas em linfócitos T infectados pelo HTLV-1”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Evandra S. R. Sandoval/ Simone K. Haddad/ Prof. Dr. Dimas T. Covas

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP-RP, em conjunto com os pesquisadores do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular do Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) e sua interação com as células-tronco do nosso corpo.

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.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) é um vírus que pode ser transmitido pelo sangue, contato sexual e da mãe grávida para o filho. A grande maioria dos indivíduos não apresenta sintomas, porém uma pequena parcela das pessoas infectadas pode ter uma doença com alteração nos nervos ou no sangue. Nos últimos anos, têm se estudado os fatores que desencadeiam a alteração nos nervos ou no sangue, porém ainda temos muito que aprender. Desta forma, esta pesquisa procura entender o papel das células-tronco humanas na infecção pelo HTLV.

Como será feita esta pesquisa?

Se você concordar em participar desta pesquisa e assinar este termo de consentimento, utilizaremos as células denominadas linfócitos T isoladas do seu sangue para análise científica do vírus HTLV.

O que será feito com as células remanescentes a este estudo?

As células remanescentes a esta pesquisa serão conservadas no banco de amostras biológicas do Laboratório de Biologia Molecular para análises futuras, com finalidade científica, como você já concordou.

Quanto tempo durará a pesquisa?

A pesquisa será concluída em dois anos.

Como você vai participar da pesquisa, e quais são os riscos que podem ocorrer?

A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 20 mL de sangue. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. A colheita de sangue será realizada no braço, com seringas e agulhas descartáveis por um profissional capacitado, podendo levar a um leve desconforto passageiro. Não há riscos decorrentes da pesquisa a não ser o desconforto da picada da agulha na coleta de sangue.

O que acontece se eu não aceitar em participar?

Caso não queira participar, o seu seguimento no ambulatório continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu atendimento e tratamento.

Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será o de auxiliar-nos a entender melhor a infecção pelo HTLV. Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. Garantimos o direito de receber respostas e esclarecimentos de quaisquer dúvidas a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa, bem como a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do seu atendimento ou tratamento.

Estamos à disposição para esclarecer qualquer dúvida sobre esta pesquisa. Neste caso, favor entrar em contato com Evandra S. Rodrigues Sandoval pelo telefone (16) 2101 9300 ramal 9606.

Eu, _____

RG nº: _____, autorizo a retirada de 20 ml do meu sangue através de punção venosa para a realização de pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a 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.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20__.

_____
Assinatura do paciente – Registro

_____
Evandra S. R. Sandoval/ Simone K. Haddad /
Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas
Pesquisadores Responsáveis

3. Aceite do Adendo pelo Comitê de Ética

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

Ribeirão Preto, 04 de janeiro de 2012

Ofício nº 70/2012
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 12462/2010
“AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DAS CÉLULAS
MESENQUIMAIS ESTROMAIS HUMANAS EM LINFÓCITOS T INFECTADOS
PELO HTLV-1”

Prezadas Senhoras,

O Comitê de Ética em Pesquisa, analisou e aprovou “AD REFERENDUM” o Adendo ao projeto de pesquisa acima mencionado, bem como o adendo ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de 19/12/2011.

O CEP aprovou a continuidade da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

4. Termo de Consentimento aprovado para coleta de medula óssea(Adendo)

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

ADENDO AO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA:

“Avaliação do efeito imunomodulador das células mesenquimais estromais humanas em linfócitos T infectados pelo HTLV-1”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Evandra S. R. Sandoval/ Simone K. Haddad/ Prof. Dr. Dimas T. Covas

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que vem sendo desenvolvida pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP-RP, em conjunto com os pesquisadores do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular do Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) e sua interação com as células-tronco do nosso corpo.

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.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) é um vírus que pode ser transmitido pelo sangue, contato sexual e da mãe grávida para o filho. A grande maioria dos indivíduos não apresenta sintomas, porém uma pequena parcela das pessoas infectadas pode ter uma doença com alteração nos nervos ou no sangue. Nos últimos anos, têm se estudado os fatores que desencadeiam a alteração nos nervos ou no sangue, porém ainda temos muito que aprender. Desta forma, esta pesquisa procura entender o papel das células-tronco humanas na infecção pelo HTLV.

Como será feita esta pesquisa?

Se você concordar em participar desta pesquisa e assinar este termo de consentimento, utilizaremos as células isoladas da sua medula óssea para análise científica do vírus HTLV.

O que será feito com as células remanescentes a este estudo?

As células remanescentes a esta pesquisa serão conservadas no banco de amostras biológicas do Laboratório de Biologia Molecular para análises futuras, com finalidade científica, como você já concordou.

Quanto tempo durará a pesquisa?

A pesquisa será concluída em dois anos.

Como você vai participar da pesquisa, e quais são os riscos que podem ocorrer?

A pessoa que participar desta pesquisa será submetido a coleta de cerca de 6 mL de medula óssea (uma colher de chá). Esta quantidade de aspirado de medula óssea retirada não será prejudicial à sua saúde. A colheita da medula é realizada com anestesia local utilizando seringas e agulhas descartáveis numa elevação óssea perto da nádega por um profissional capacitado. Os riscos decorrentes da coleta são equivalentes aos riscos da coleta de sangue. No entanto, pode haver desconforto relacionado ao procedimento, que pode gerar dor passageira (cessa após o término da coleta) e hematoma nos locais de punção.

O que acontece se eu não aceitar em participar?

Caso não queira participar, o seu seguimento no ambulatório continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu atendimento e tratamento.

Haverá alguma despesa ou benefício com este estudo?

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. O único benefício será o de auxiliar-nos a entender melhor a infecção pelo HTLV. Afirmamos que os dados obtidos serão guardados de maneira sigilosa e que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. Garantimos o direito de receber respostas e esclarecimentos de quaisquer dúvidas a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa, bem como a liberdade de retirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do seu atendimento ou tratamento.

Estamos à disposição para esclarecer qualquer dúvida sobre esta pesquisa. Neste caso, favor entrar em contato com Evandra S. Rodrigues Sandoval pelo telefone (16) 2101 9300 ramal 9606.

Declaro ter lido e entendido este termo e concordo em participar do estudo, autorizando também a utilização dos dados e, se necessário, o armazenamento de material biológico pelos pesquisadores envolvidos. Declaro ainda estar ciente, que a minha participação neste estudo não me trará nenhum benefício imediato.

Doador: _____ RG: _____ DATA _____

Médico: _____ RG: _____ DATA _____

Testemunha: _____ RG: _____ DATA _____

5. Artigo científico

Virology 449 (2014) 190–199

Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yviro

HTLV-1 infects human mesenchymal stromal cell *in vitro* and modifies their phenotypic characteristics[☆]

Evandra Strazza Rodrigues^{a,b}, Mayra Dorigan de Macedo^{a,b}, Mariana Tomazini Pinto^{a,b},
Maristela Delgado Orellana^{a,c}, Maurício Cristiano Rocha Junior^{a,b},
Danielle Aparecida Rosa de Magalhães^a, Yuetsu Tanaka^d, Osvaldo Massaiti Takayanagui^c,
Dimas Tadeu Covas^{a,c}, Simone Kashima^{a,b,*}

^a Regional Blood Center of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

^b School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

^c School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

^d University of the Ryukyus, Okinawa, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 July 2013

Returned to author for revisions

13 September 2013

Accepted 13 November 2013

Available online 6 December 2013

Keywords:

HTLV-1

Human mesenchymal stromal cells

MSC differentiation

MSC virus infection

ABSTRACT

The typical characteristics of mesenchymal stem cells (MSCs) can be affected by inflammatory microenvironment; however, the exact contribution of HTLV-1 to MSC dysfunction remains to be elucidated. In this study, we demonstrated that MSC cell surface molecules VCAM-1 and ICAM-1 are upregulated by contact with HTLV-1, and HLA-DR was most highly expressed in MSCs co-cultured with MT2 cells. The expression levels of VCAM-1 and HLA-DR were increased in MSCs cultured in the presence of PBMCs isolated from HTLV-1-infected symptomatic individuals compared with those cultured with cells from asymptomatic infected individuals or healthy subjects. HTLV-1 does not impair the MSC differentiation process into osteocytes and adipocytes. In addition, MSCs were efficiently infected with HTLV-1 *in vitro* through direct contact with HTLV-1-infected cells; however, cell-free virus particles were not capable of causing infection. In summary, HTLV-1 can alter MSC function, and this mechanism may contribute to the pathogenesis of this viral infection.

© 2013 Published by Elsevier Inc.

Background

Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a human retrovirus that is associated with two major diseases known as

Abbreviations: MSC, mesenchymal stromal cells; BM, bone marrow; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; HAM/TSP, HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis; HAC, HTLV asymptomatic carriers; ATLL, adult T-cell leukemia/lymphoma; CMV, cytomegalovirus; HHV, human herpesvirus; HHV8; PPARY, peroxisome proliferator-activated receptors gamma; RUNX-2, runt-related transcription factor-2; CD73, NT5E, 5-nucleotidase, ecto; HLA-class I, human major histocompatibility complex, class I; CD45, leukocyte common; CD90, THY1, Thy-1 cell surface antigen; CD105, ENG, endoglin; CD106, VCAM1, vascular cell adhesion molecule 1; CD13, aminopeptidase-N; HLA-ABC, human major histocompatibility complex (MHC) class I, HLA-A, B, C; CD271, NGFR, nerve growth factor receptor; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ACTB, beta-actin; NRP1, neuropilins 1; HSPG2, heparan sulfate proteoglycan 2; GLUT1, solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1; URE, expression relative units

[☆]Institution where processing and analysis were performed: Molecular Biology Laboratory, Regional Blood Center of Ribeirão Preto, Rua Tenente Catão Roxo 2501, 14051-140 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

* Corresponding author at: Regional Blood Center of Ribeirão Preto, Avenida Tenente Catão Roxo 2501, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Fax: +55 16 2101 9309.

E-mail address: skashima@hemocentro.fmrp.usp.br (S. Kashima).

adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Only a small fraction (0.25% to 5%) of HTLV-1-infected individuals develops HAM/TSP, whereas 2% to 5% develop ATLL (Osame et al., 1986; Uchiyama, 1997), but other inflammatory disorders, including myositis, peripheral neuropathy, uveitis, arthritis, Sjögren syndrome, and alveolitis, have also been related to HTLV-1 infection (Oh and Jacobson, 2008). HAM/TSP is characterized as a chronic progressive inflammatory disease that initiates as an inflammatory disorder and progresses to a chronic long-term degenerative disease (Araújo et al., 1995). This inflammatory response can be characterized by the presence of HTLV-1-specific antibodies and the infiltration of T lymphocytes into the peripheral blood and cerebrospinal fluid (CSF). In response to the presence of HTLV-1, CNS infiltrating lymphocytes and resident cell populations trigger the release of cytotoxins, particularly pro-inflammatory cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- γ (IFN- γ), to cause an inflammatory response (Umehara et al., 1993, 1994; Jacobson et al., 1992).

It is still unclear why only a small subset of HTLV-1-infected individuals develops clinical diseases whereas the majority remains HTLV-1 asymptomatic carriers (HACs). Previous studies

0042-6822/\$ – see front matter © 2013 Published by Elsevier Inc.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.viro.2013.11.022>