UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do efeito dos exossomos na infecção pelo vírus
linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)**

Katia Kaori Otaguiri

Ribeirão Preto
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do efeito dos exossomos na infecção pelo vírus
linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)**

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Katia Kaori Otaguiri

Orientadora: Profa. Dra. Simone Kashima Haddad

Co-orientador: Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira

Ribeirão Preto
2018

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

OTAGUIRI, Katia Kaori

Avaliação do efeito dos exossomos na infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas do tipo (HTLV-1), 2018.

90 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. Exossomos; 2. HTLV-1; 3. HAM/TSP; 4. Tax; 5. IFN- γ ; 6. TNF- α

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Katia Kaori Otaguiri

Título do trabalho: Avaliação do efeito dos exossomos na infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas do tipo (HTLV-1)

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

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Simone Kashima Haddad

Co-orientador: Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira

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, por serem a minha maior
inspiração em tudo que faço.*

Ao meu marido, por sempre estar ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pelo dom da vida e por plantar sempre a sementinha da fé;

À minha orientadora **Prof. Dra. Simone Kashima Haddad**, por todos os anos de convivência, carinho e amizade, pelo exemplo de mulher, mãe e profissional. Obrigada por todos os ensinamentos que serão levados durante toda a minha vida;

Aos meu co-orientador **Juliando Coelho da Silveira**, por todo o conhecimento compartilhado e pelo auxílio nos experimentos;

Às agências de fomento **CNPq** (processo nº 140086/2017-0) e **CAPES**, pela bolsa de doutorado concedida para o desenvolvimento deste projeto;

Ao **Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas** e à **Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto** pela oportunidade e viabilização de todos os experimentos;

Ao **Laboratório de Citometria de Fluxo**. À *Patrícia Vianna Bonini* pela paciência e pelos ensinamentos, à *Camila Cristina de Oliveira Menezes* pelas valiosas contribuições e disponibilidade em realizar os experimentos.

Ao **Laboratório de Morfofisiologia Molecular do Desenvolvimento** da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (USP-Pirassununga), do *Prof. Flávio Vieira Meirelles*, pela oportunidade de viabilização de alguns experimentos;

Às secretárias **Carmem Cecília de Oliva Simão** pelo estimado auxílio, e **Dalva Tereza Catto** pelo carinho e abraço de sempre;

À **Seção de Pós-Graduação** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial ao *Henrique Theodoro*, por ser o herói da última hora e por sempre ter um sorriso e uma palavra amiga;

Aos **meus queridos amigos do Laboratório de Biologia Molecular**, *Alexander, Daiane, Evandra, Fernanda, Jonathan, Juliana, Martha, Péricles, Rafaela, Slav, Vanessa e Yann*, sem esquecer dos que já passaram pela BioMol, por todo o apoio, discussões e valiosas contribuições científicas durante este tempo. Obrigada, principalmente, pelas conversas, risadas e linda amizade.

***“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez”.***

(George Bernard Shaw)

RESUMO

OTAGUIRI, K.K. Avaliação do efeito dos exossomos na infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1). 2018. 90f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) é o agente etiológico de duas principais manifestações clínicas, a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) e a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL). O desenvolvimento de HAM/TSP, uma doença neuroinflamatória crônica é relacionada a uma complexa interação entre vírus e resposta imunológica do hospedeiro. A expressão do gene viral *tax* desempenha um papel importante na patogênese da HAM/TSP pela ativação de diversos genes celulares, incluindo genes das citocinas inflamatórias IFN- γ e TNF- α . Recentemente, os exossomos surgiram como um importante fator na comunicação célula-célula contribuindo em diversos processos celulares, inclusive na modulação do sistema imunológico. Considerando o potencial papel dos exossomos na imunomodulação e no processo inflamatório, o objetivo deste trabalho foi avaliar se os exossomos produzidos por células infectadas pelo HTLV-1 carregam moléculas virais e se poderiam participar dos processos de imunomodulação e inflamação crônica observados na HAM/TSP. Os exossomos foram isolados de células infectadas pelo HTLV-1 da linhagem celular C8166, avaliados quanto à presença de RNAm viral *tax* e testados quanto à capacidade de ativar células mononucleares do sangue periférico (PBMC) à indução de resposta inflamatória. Neste trabalho, foi observado que, após a exposição de PBMC aos exossomos contendo RNAm viral *tax*, a expressão da citocina inflamatória IFN- γ foi aumentada em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ quando comparado ao grupo não exposto aos exossomos. Foi observado um pequeno aumento de TNF- α no grupo exposto aos exossomos. Não houve diferença na expressão das citocinas IL-4, perforina e granzima B. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem que exossomos contendo *tax* isolados de células infectadas pelo HTLV-1 induzem a produção de citocinas inflamatórias ativam a resposta imunológica de padrão Th1, e não Th2. Estes achados podem contribuir na elucidação do papel dos exossomos na infecção pelo HTLV-1 e nos estudos relacionados à patogênese da HAM/TSP e à resposta inflamatória envolvendo a apresentação clínica desta doença.

Palavras-chave: Exossomos; HTLV-1; HAM/TSP; Tax; Interferon-gamma; IFN- γ ; TNF- α .

ABSTRACT

OTAGUIRI, K.K. **Evaluation of the exosomes effect in human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection.** 2018. 90f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is the etiological agent of HTLV-1 associated myelopathy/tropical paraparesis spastic (HAM/TSP) and adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). The development of HAM/TSP, a chronic neuroinflammatory disease, is correlated to a complex host-virus dynamic immune response interaction. Tax expression plays an important role in HAM/TSP pathogenesis by activating various cellular genes, including the cytokines IFN- γ and TNF- α . Exosomes have emerged as an important factor of cell-to-cell communication contributing to diverse cellular processes, including immune modulation. Considering the potential role of exosomes in modulating the immune response and inflammation, the main objective of this study was to examine if HTLV-1-infected cells produce exosomes can carry viral *tax* mRNA, and if they can participate in the chronic inflammation observed in patients with HAM/TSP. Exosomes were isolated from HTLV-1-infected cell line culture, evaluated for the *tax* mRNA presence and tested for the ability to activate peripheral mononuclear cells (PBMC) in inducing an inflammatory immune response. We observed that the proinflammatory cytokine IFN- γ was upregulated in CD4 and CD8 T-cells after treatment of the PBMC with Tax carrying exosomes compared to the negative control. The expression of TNF- α was slightly upregulated. IL-4, Granzyme B and Perforin did not show alterations. Taken together, these results suggest that exosomes carrying Tax isolated from HTLV-1-infected cells might induce the production of proinflammatory cytokines and activate T helper (Th)₁, and not Th₂, immune response. This study may have important impact on the studies involving the pathogenesis of HAM-TSP and the inflammatory response involved in the clinical presentation of the disease.

Keywords: Exosomes; HTLV-1; HAM/TSP; Tax; IFN- γ ; TNF- α .

RESUMEN

OTAGUIRI, K.K. **Evaluación del efecto de los exosomas en la infección por el virus linfotrópico de células humano tipo 1 (HTLV-1).** 2018. 90f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

El virus linfotrópico de células T humano de tipo 1 (HTLV-1) es el agente etiológico de dos principales manifestaciones clínicas, la mielopatía asociada al HTLV-1 / paraparesia espástica tropical (HAM / TSP) y la leucemia / linfoma de células T del adulto (ATLL). El desarrollo de HAM / TSP, una enfermedad neuroinflamatoria crónica, se relaciona con una interacción compleja entre el virus y la respuesta inmune del huésped. La expresión del gen viral *tax* desempeña un papel importante en la patogénesis de HAM / TSP por la activación de diversos genes celulares, incluyendo genes de citocinas inflamatorias IFN- γ y TNF- α . Recientemente, los exosomas surgieron como un importante factor en la comunicación célula-célula contribuyendo en diversos procesos celulares, incluso en la modulación del sistema inmunológico. Considerando el papel potencial de los exosomas en la inmunomodulación y en el proceso inflamatorio, el objetivo de este trabajo fue evaluar si los exosomas producidos por células infectadas por el HTLV-1 cargan moléculas virales y se podrían participar de los procesos de inmunomodulación y inflamación crónica observados en HAM / TSP. Los exosomas fueron aislados de células infectadas por el HTLV-1 del linaje celular C8166, evaluados en cuanto a la presencia de RNAm viral *tax* y se comprobó en cuanto a la capacidad de activar células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) para inducir una respuesta inflamatoria inmune. En este trabajo, se observó que, después de la exposición de PBMC a los exosomas que contenía RNAm viral *tax*, la expresión de la citocina inflamatoria IFN- γ se incrementó en linfocitos T CD4 + y CD8 + en comparación con el grupo no expuesto a los exosomas. Se observó un pequeño aumento de TNF- α en el grupo expuesto a los exosomas. No hubo diferencia en la expresión de las citocinas IL-4, perforina y granzima B. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que exosomas que llevan *tax* aislados de células infectadas por el HTLV-1 pueden inducir la producción de citocinas inflamatorias y activar la respuesta inmunológica de patrón Th1, y no Th2. Estos hallazgos pueden contribuir a dilucidar el papel de los exosomas en la infección por el HTLV-1 y en los estudios relacionados con la patogénesis de la HAM / TSP y la respuesta inflamatoria que involucra la presentación clínica de esta enfermedad.

Palabras clave: Exosomas; HTLV-1; HAM / TSP; Tax; IFN- γ ; TNF- α .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da partícula viral do HTLV-1.....	5
Figura 2. Via de biogênese de microvesículas e exossomos.	14
Figura 3. Desenho esquemático da estratégia do estudo.	23
Figura 4. Imagens representativas dos exossomos obtidas por microscopia eletrônica de transmissão e visualizadas por contraste negativo.	37
Figura 5. Tamanho e distribuição de tamanho dos exossomos avaliados por Dynamic Light Scattering (DLS).....	38
Figura 6. Tamanho dos exossomos avaliados por <i>Nanoparticle Tracking Analyses</i> (NTA). .	40
Figura 7. Expressão de Alix, CD63 e citocromo C em exossomos isolados de células da linhagem C8166.....	41
Figura 8. Amplificação dos RNAm de actina e tax nos exossomos.....	42
Figura 9. Amplificação dos RNAm de actina e tax nas PBMC.	43
Figura 10. Expressão de citocinas por PBMC de indivíduos saudáveis após exposição aos exossomos isolados de células HTLV-1.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de <i>primers</i> utilizados para reações de transcrição reversa.....	29
Tabela 2. Sequência de <i>primers</i> e sonda utilizados para reações de PCR em tempo real.	30

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1: *Activator protein 1*

ATLL: Leucemia/linfoma de células T do adulto

BHE: Barreira hematoencefálica

CA: Capsídeo

CD: Célula dendrítica

CEP: Comitê de Ética de Pesquisa em Humanos

CMV: Corpos multivesiculares

CREB: *cAMP response function-associated element binding*

CTL: Límfocto T citotóxico

EBV: Vírus Epstein-Barr

GLUT-1: transportador de glicose 1

GM-CSF: Fator de estimulação de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos

HAM/TSP: Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical

HBZ: *bZIP fator*

HCV: Vírus da hepatite C

HHV-8: Herpes vírus humano-8

HIV-1: Vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HSPG: proteoglicana heparan sulfato

HTLV: Vírus linfotrópico de células T humanas

IFN: Interferon

IL: Interleucina

LTR: *long terminal repeats*

MA: Matriz viral

NC: Nucleocapsídeo

NF- κ B: *Nuclear factor κ B*

NRP-1: neurofilina 1

ORF: *open read frames*

Pb: Pares de base

PBMC: Células mononucleares de sangue periférico

RNase H: Ribonuclease H

SRF: *Serum response binding*

STLV: Vírus linfotrópico de células T símias

TAR: Proteína de resposta transativadora

TNF: Fator de necrose tumoral

TR: Transcriptase reversa

VE: Vesículas extracelulares

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	2
1. VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS (HTLV)	2
2. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HTLV-1.....	3
3. ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HTLV-1.....	4
3.1. ESTRUTURA VIRAL.....	4
3.2. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA.....	6
4. TRANSMISSÃO VIRAL	7
5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	9
5.1 LEUCEMIA/LINFOMA DE CÉLULAS T DO ADULTO (ATLL)	10
5.2. MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-1 PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL (HAM/TSP)	10
6. VESÍCULAS EXTRACELULARES - EXOSSOMOS	12
7. EXOSSOMOS E AS INFECÇÕES VIRAIS	16
II. OBJETIVOS	21
1. OBJETIVO GERAL.....	21
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
III. METODOLOGIA.....	23
1. LINHAGEM CELULAR.....	23
2. CASUÍSTICA	24
3. ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS	24
4. CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS	25
4.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	25
4.2. ANÁLISE DO DIÂMETRO MÉDIO E ÍNDICE DE POLIDISPERSÃO DOS EXOSSOMOS.....	26
4.3. ANÁLISE DE RASTREAMENTO DE NANOPARTÍCULAS	26
4.4. ANÁLISE DE MARCADORES PROTEICOS ESPECÍFICOS DE EXOSSOMOS	27
4.4.1. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	27
4.4.2. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	27

4.4.3. WESTERN BLOTTING	28
5. ANÁLISE DO CONTEÚDO DOS EXOSSOMOS	29
5.1. DETECÇÃO DE RNA VIRAL.....	29
5.1.1. EXTRAÇÃO DE RNA EXOSSOMAL	29
5.1.2. TRANSCRIÇÃO DE RNA EM cDNA.....	29
5.1.3. DETECÇÃO DO GENE TAX POR PCR EM TEMPO REAL	30
6. ENSAIO DE IMUNOESTIMULAÇÃO.....	30
6.1. ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO	30
6.2. ENSAIO DE IMUNOESTIMULAÇÃO DAS PBMC POR EXOSSOMOS.....	31
7. AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DO RNA VIRAL TA	32
8. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NAS PBMC.....	33
9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	34
IV. RESULTADOS	36
1. ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS	36
2. VISUALIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DOS EXOSSOMOS	36
3. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DOS EXOSSOMOS	38
4. TAMANHO E CONCENTRAÇÃO DOS EXOSSOMOS.....	39
5. DETECÇÃO DE MARCADORES PROTEICOS ESPECÍFICOS DE EXOSSOMOS.....	40
6. DETECÇÃO DO RNA VIRAL TAX NOS EXOSSOMOS.....	41
7. ENSAIOS DE IMUNOESTIMULAÇÃO	16
7.1. AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DO CONTEÚDO EXOSSOMAL PARA AS PBMC	43
7.2. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS.....	44
V. DISCUSSÃO	48
VI. CONCLUSÃO	58
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
VIII. ANEXOS	48

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS (HTLV)

O vírus linfotrópico de células T humanas ou, recentemente denominado Vírus da Leucemia de Células T Humanas (HTLV), foi o primeiro retrovírus descrito em humanos (Poiesz et al., 1980), inicialmente relacionado a casos de doenças linfoproliferativas (Poiesz et al., 1980) e, em seguida, a neuromielopatia crônica (Gessain, 1985). Atualmente, sabe-se que a infecção pelo HTLV-1 é fator causal de duas principais manifestações: A leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e mielopatia associada ao HTLV ou paraparesia espástica tropical (HAM/TSP).

O HTLV-1 também é vírus causador de outras síndromas inflamatórias em diversos órgãos, como dermatite infecciosa, uveíte, síndrome sicca (Mochizuki et al., 1996; LaGrenade et al., 1990; Nishioka et al., 1989). O HTLV-1 ainda é frequentemente associado a artropatias e infecções pulmonares, como bronquite e bronquiolite (revisado em Bangham, 2017). Ademais, o HTLV-1, apesar de não causar imunossupressão, predispõe a infecções por certos patógenos, particularmente *Mycobacterium tuberculosis*, *Strongyloides stercoralis*, *Staphylococcus aureus* e *Sarcoptes scabieri* (revisado em Bangham, 2017).

Desde o isolamento do HTLV-1, mais três tipos virais foram descritos, o 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 foi isolado de uma linhagem contínua de células T obtidas de um paciente com tricoleucemia (leucemia de células pilosas) e compartilha 65% de homologia na sequência de nucleotídeos com o HTLV-1 (Sodroski, 1992) dependendo da região analisada, o que determina a codificação e a síntese de diversos produtos gênicos semelhantes. Este vírus não causa leucemia, embora alguns indivíduos infectados possam desenvolver uma linfocitose benigna e, raramente, alguns sintomas neurológicos (Biswas et

al., 2009; Feuer and Green, 2005; Dooneief et al., 1996; Hjelle et al., 1992) Atualmente, apenas quatro casos isolados do HTLV-3 foram relatados, obtidos de indivíduos camaronenses (Zheng et al., 2010; Calattini et al., 2009). Sugere-se que este vírus tenha origem zoonótica, uma vez que se acredita que o Vírus Linfotrópico de Células T de Símios tipo 3 (SLTV-3) tenha sido transmitido a humanos por primatas não humanos infectados pelo vírus homólogo símio. O HTLV-4 consiste de apenas um caso humano, cujo provírus foi obtido de um caçador Camaronense. Para este tipo viral, não foi identificado nenhum equivalente de STLTV (Wolfe et al., 2005). As poucas informações existentes sobre o HTLV-3 e HTLV-4 não são suficientes para determinar se estes vírus podem ser transmitidos entre humanos e se são capazes de desencadear doenças em seus portadores (Wolfe et al., 2005).

2. EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HTLV-1

Poucos estudos estimam a prevalência global da infecção pelo HTLV-1. Estima-se que o número de indivíduos infectados pelo HTLV-1 seja entre cinco e dez milhões (Gessain and Cassar, 2012). No entanto, acredita-se que este número seja subestimado uma vez que estudos epidemiológicos sistemáticos não tenham sido realizados na maioria das regiões endêmicas (Gessain and Cassar, 2012). Embora presente em todo o mundo, algumas regiões apresentam uma maior prevalência África Subsaariana, América do Sul e bacia do Caribe, norte do Irã, sul do Japão, Austrália central e Melanesia (revisado por Bangham, 2017). Na Europa, apenas a Romênia apresenta-se como uma região endêmica do HTLV-1. A origem e causa dessa distribuição geográfica não é bem definida, mas sugere-se que esteja relacionada a algum fator dos grupos populacionais dessas regiões, seguida por uma alta taxa de transmissão viral. Nessas áreas endêmicas, as taxas de soroprevalência variam de 0,1 a 30% (Sonoda et al., 2011; Gotuzzo et al., 2000; Saxinger et al., 1984; Blattner et al., 1982).

A maior parte dos estudos de epidemiologia é realizada em populações específicas, principalmente em doadores de sangue, gestantes e pacientes hospitalizados. As características epidemiológicas e demográficas de doadores de sangue são diferentes de acordo com a região. Além disso, a prevalência da infecção pelo HTLV-1 varia de acordo com a idade, sexo e nível econômico na maioria das áreas endêmicas. Dessa forma, a prevalência real é provavelmente superior, na maioria dos casos, do que constatado em doadores de sangue (revisado por Gessain & Cassar, 2012). Assim, estima-se que no Brasil, 2,5 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 (Carneiro-Proietti et al., 2002), no qual o estado de Salvador é o mais prevalente, com 1,35% de indivíduos infectados na coorte estudada (Galvao-Castro et al., 1997). Na região de Ribeirão Preto, a soroprevalência entre doadores de sangue é de 0,1% (Pinto et al., 2012). Essa prevalência é maior que cidades como Manaus (0,08%) e Florianópolis (0,08%) (Galvao-Castro et al., 1997) e menor do que a observada no estado de São Paulo (0,2%) (Ferreira Junior et al., 1995) e Recife (1,35%) (Galvao-Castro et al., 1997).

3. ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HTLV-1

3.1. Estrutura viral

O HTLV-1 pertence à família *Retroviridae*, à subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus*. Este vírus consiste de um envelope, um nucleocapsídeo icosaédrico e um nucleóide, medindo cerca de 100 nm. O envelope viral é constituído por uma bicamada lipídica de origem celular, a qual contém uma proteína transmembrana (gp21) ancorada em uma glicoproteína de superfície (gp46). Junto à membrana do envelope encontra-se a matrix viral (MA), composta por proteínas p19. O capsídeo (CA) é composto por proteínas

codificadas pelo gene *gag* e constitui o cerne da partícula viral. Esta estrutura abriga o genoma viral composto por duas fitas de RNA, as quais estão associadas a pequenas proteínas, chamadas de proteínas do nucleocapsídeo (NC). Outras proteínas estão presentes no interior do CA, como a transcriptase reversa (TR) e integrase, essenciais no processo de integração do DNA proviral no genoma da célula hospedeira.

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da partícula viral do HTLV-1.

Na figura, as principais proteínas virais da partícula do HTLV-1 estão indicadas por linhas (modificado de Lairmore et al., 2012).

3.2. Organização genômica

Este retrovírus possui duas fitas de RNA fita simples e o genoma proviral contém aproximadamente 9032 pb (Seiki et al., 1983) flanqueados por duas regiões repetidas e terminais, chamadas LTR (*long terminal repeats*). O genoma do HTLV-1 codifica as proteínas estruturais e enzimáticas típicas dos retrovírus (Gag, Pol e Env). Além disso, o HTLV-1 utiliza de *splicing* alternativo e códons de iniciação internos para produzir várias proteínas regulatórias e acessórias. Esses códons de iniciação internos iniciam quatro fases de leitura aberta (ORFs) na região pX do genoma viral, entre *env* e a extremidade 3'LTR.

O gene *pol* codifica a TR, RNase H, IN e protease. O gene *gag* codifica um precursor poliprotéico, e sua clivagem origina as proteínas da MA (p19), do CA (p24) e do NC (p15). O gene *env* codifica as proteínas do envelope viral. A proteína precursora (gp62) é clivada para gerar os produtos maduros, a gp46 e a gp21. As proteínas Env do HTLV-1 são altamente conservadas geneticamente entre os isolados, e a variabilidade na sequência de aminoácidos varia de 1 a 8% (Feuer and Green, 2005; Gessain et al., 1996). O gene *pro* é codificado por desvio de leitura dos genes *gag* e *pol*. A enzima Pro atua sobre as cadeias poliprotéicas, clivando-as para a formação das proteínas estruturais maduras encontradas na partícula viral.

A região pX contém quatro ORFs que codificam proteínas regulatórias (Tax, Rex, HBZ) e acessórias (p12/p8, p13, p30). A proteína Rex regula a expressão gênica viral em nível postranscricional. A proteína Tax modula a expressão viral recrutando fatores de transcrição para a região 5'LTR. Além disso, Tax atua em importantes vias de processos de proliferação, ciclo celular e apoptose, ativando fatores de transcrição como CREB (*cAMP response function-associated elemento binding*), SRF (*serum response binding 1*), AP-1 (*activator protein 1*) e NF- κ B (*nuclear fator κ B*), e atuando diretamente em reguladores de ciclo celular e *checkpoints*. A proteína HBZ é codificada por um RNA mensageiro *anti-sense*.

e sequestra fatores de transcrição diminuindo a transcrição do genoma viral mediada por Tax. Ainda, HBZ reprimi a via clássica de sinalização de NF- κ B. Por fim, sugere-se que esta proteína esteja envolvida em etapas finais da oncogênese.

4. TRANSMISSÃO VIRAL

A transmissão viral ocorre por três vias: (1) Vertical, atribuída principalmente pela amamentação por períodos superiores aos 6 meses de idade (Hino, 2011); (2) sexual (Kaplan et al., 1996; Murphy et al., 1989a); (3) parenteral, que consiste na transmissão por hemoderivados contaminados, principalmente linfócitos contaminado pelo HTLV-1 (Okochi et al., 1984). O HTLV-1 também é encontrado em usuários de drogas intravenosas, mas em uma extensão bem menor do que o HTLV-2 (Murphy et al., 1999). A transmissão viral pelo aleitamento materno é a principal via de disseminação do vírus com eficiência de cerca de 20% (Kusuhara et al., 1987).

Uma vez na corrente sanguínea, o HTLV-1 infecta preferencialmente linfócitos T CD4⁺, entretanto sabe-se que os linfócitos T CD8⁺ são importantes reservatórios virais. A entrada do vírus na célula é facilitada pelos receptores celulares proteoglicanas de heparan sulfato (HSPG) e neurofilina-1 (NRP-1) e pelo transportador de glicose (GLUT-1). Dessa forma, ocorre predileção do HTLV-1 por linfócitos T CD4⁺, visto que estes receptores HSPG estão presentes em maior quantidade na superfície de linfócitos T *helper* (Jones et al., 2008)

A transmissão do HTLV-1 a partir de partículas virais livres e infectantes tem sido alvo de muitas discussões. Os primeiros estudos demonstravam a necessidade da célula infectada pelo vírus no mecanismo de transmissão, ao observarem que pacientes que haviam submetidos à transfusão com componentes celulares do sangue de indivíduos infectados pelo HTLV-1 tornaram-se infectados (Maeda et al., 1984; Miyamoto et al., 1984). Por outro lado,

pacientes transfundidos com produtos acelulares como plasma, não eram infectados pelo HTLV-1 (Lairmore et al., 1989; Maeda et al., 1984). Corroborando, estudos *in vitro* demonstraram ausência de infecção viral em linfócitos T isolados do sangue periférico quando em contato com partículas virais livres e uma eficiente infecção quando as mesmas células (linfócitos T) foram cocultivadas com linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1 (Popovic et al., 1983; Yamamoto et al., 1982).

Entretanto, outros estudos *in vitro* demonstraram que a partícula viral livre é capaz de infectar outros tipos celulares. Vários estudos evidenciaram que células dendríticas (CD) primárias são rotineiramente infectadas por partículas virais livres (Jain et al., 2009; Jones et al., 2008; Valeri et al., 2010). Além disso, linfócitos T cocultivados com CDs são rapidamente infectados após adição de partículas virais.

As partículas virais livres do HTLV-1 são raramente detectadas em plasma ou soro de indivíduos infectados por este vírus. Essa informação explica o fato dos pacientes transfundidos com plasma/soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1 não sofrerem conversão. As partículas virais livres do HTLV-1 são infecciosas, no entanto, como não há níveis detectáveis de vírus nesse produto sanguíneo a infecção não ocorre por esta via. Essa informação indica que quando ocorre a transfusão de plasma/soro infectados pelo HTLV-1 para indivíduos saudáveis, a infecção não ocorre devido a ausência de níveis detectáveis do vírus, e não porque as partículas virais livres não são infecciosas (revisado por (Pique and Jones, 2012)).

Vários estudos demonstraram que o sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 continha clones de várias células infectadas com o mesmo sítio de integração viral (Leclercq et al., 1998; Wattel et al., 1995), indicando que eles foram derivados de uma mesma célula infectada. Outros estudos demonstraram que clones específicos podem persistir durante anos em um dado indivíduo (Etoh et al., 1997; Cavrois et al., 1996).

A presença desses clones indica que em vez de se propagar de célula em célula, o HTLV-1 persiste em um indivíduo primariamente por replicação mitótica das células infectadas. Consistente com isso, a quantidade de provírus nas células infectadas (conhecida como carga proviral) permanece estável durante toda a vida da pessoa. Além disso, o genoma do HTLV-1, diferente do HIV-1, possui pouca variação entre indivíduos, corroborando com o fato de o genoma ser replicado pela DNA polimerase, e não pela transcriptase reversa, mais propensa a erros. Dessa forma, o HTLV-1 persiste no indivíduo infectado por meio de dois estágios. Logo após a exposição do indivíduo ao vírus, o HTLV-1 se propaga por meio de contato célula-célula. Em seguida, durante o estágio crônico da infecção, o vírus persiste por meio de expansão clonal.

O HTLV-1 apresenta uma notável estabilidade genética, incomum para um retrovírus. Essa característica suporta a hipótese de que a amplificação viral *in vivo* por expansão clonal das células infectadas seja uma das mais importantes, e pode ser utilizada como uma ferramenta molecular para rastrear os meios de disseminação do vírus entre populações (Gessain et al., 1992).

5. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O HTLV-1 é o agente causal de duas doenças, a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). A maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanece como portador assintomático durante toda a vida. Entretanto, há risco de 0,3- 4% de esses indivíduos desenvolverem HAM/TSP (Kaplan et al., 1990) e 1-5% de desenvolverem ATLL (Murphy et al., 1989b).

5.1. Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL)

A ATLL foi primeiramente a primeira doença maligna identificada como causada por um retrovírus. A ATLL é definida como uma doença fatal das células T CD4⁺ periféricas e que contém o DNA proviral do HTLV-1 (provírus) integrado em seu genoma.

O HTLV-1, embora apresente um potencial genômico oncogênico, não possui nenhum oncogene derivado de seu genoma celular. Sua capacidade oncogênica advém da atividade reguladora de Tax, que é capaz de alterar a expressão de genes celulares envolvidos no controle do crescimento celular (Yoshida, 2001).

O início da doença é precedido por um longo período de latência, havendo uma fase pré-ATL, definida pela expansão oligoclonal dos linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1. A doença é heterogênea e possui quatro apresentações clínicas distintas: indolente ou *smouldering*, crônica, aguda e linfomatosa (Shimoyama, 1991). A sobrevida média das duas primeiras formas é de dois anos ou mais, e, em contraste, nas formas agudas e linfomatosa observa-se uma sobrevida média menor que seis meses. Os pacientes com ATLL são submetidos à poliquimioterapia, entretanto, o tratamento existente não aumenta a sobrevida média (Yamaguchi and Watanabe, 2002).

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

A HAM/TSP é uma doença neuroinflamatória caracterizada por uma mielopatia progressiva crônica com infiltrado de células mononucleares no sistema nervoso central, sobretudo nas áreas de desmielinização e distrofia axonal (Cooper et al., 2009). O processo de inflamação crônica é caracterizada por proliferação espontânea de linfócitos T *in vitro* n

(Lunardi-Iskandar et al., 1993) e elevada produção de interferon (IFN)- γ e fator de necrose tumoral (TNF)- α *ex vivo* por células mononucleares do sangue periférico (Brito-Melo et al., 2001).

A patogênese de HAM/TSP não foi totalmente elucidada e fatores virais e do hospedeiro, como carga proviral e resposta imunológica são fundamentais na progressão da doença (Bangham and Osame, 2005; Lepoutre et al., 2009). Três mecanismos principais foram propostos a fim de explicar o papel do HTLV-1 no desenvolvimento da HAM/TSP, o da citotoxicidade direta, o da autoimunidade, e o do dano colateral. No primeiro mecanismo, o dano neurológico é uma consequência direta da resposta antiviral de linfócitos T citotóxicos (CTL). Neste processo, pressupõe-se que o HTLV-1 infecta células residentes no sistema nervoso central, como astrócitos, neurônios e oligodendrócitos, os quais apresentariam antígenos virais em sua superfície celular. Os CTLs específicos atravessariam a barreira hematoencefálica (BHE), e encontrariam as células infectadas, causando sua morte por liberação de citocinas. No segundo mecanismo, uma resposta autoimune seria ativada pela reatividade cruzada de proteínas neuronais com anticorpos anti-Tax. Os linfócitos T CD4⁺ encontrariam o antígeno viral na periferia e ao atravessarem a BHE, confundiriam a célula neuronal com uma célula infectada, disparando uma resposta imunológica contra essas células. No terceiro mecanismo, linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1 e CTLs específicos contra o vírus migrariam através da BHE, se encontrariam no sistema nervoso central e as células da glia seriam degradadas pelas citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos CTLs contra os linfócitos T CD4⁺ infectados.

Linfócitos T CD4⁺ e CTLs específicos para o HTLV-1 secretam citocinas pró-inflamatórias, como interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1, IL-6, fator de estimulação de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), quimiciocinas e metaloproteinases potencialmente inflamatórias (Biddison et al., 1997;

Kuroda et al., 1993; Ohbo et al., 1991), as quais são tóxicas em altas concentrações, corroborando com o terceiro mecanismo de desenvolvimento de HAM/TSP ou mecanismo dano colateral.

Muitos debates inerentes à função da resposta imunológica na determinação das manifestações clínicas relacionadas ao HTLV-1 questionam como a maioria dos indivíduos soropositivos permanece assintomática e portadores do vírus, enquanto uma pequena parcela desenvolve doença inflamatória crônica conhecida, como HAM/TSP. Diversos fatores parecem estar envolvidos na interação vírus/hospedeiro e no aparecimento das patologias, entretanto, os mecanismos não estão totalmente esclarecidos (Sabouri et al., 2005). A maioria dos estudos genotípicos do HTLV-1 não mostra associação entre variantes do vírus e o risco de se desenvolver HAM/TSP (Bangham & Osame, 2005). Várias estudos sugerem que alguns fatores como subgrupo viral, resposta imunológica e características genéticas do hospedeiro podem estar envolvidos com o desenvolvimento dos sintomas (Catalan-Soares et al., 2009; Haddad et al., 2011; Rocha-Junior et al., 2012 ; Talledo et al.). Entretanto não há um marcador biológico que caracterize o estabelecimento da doença em alguns indivíduos.

6. VESÍCULAS EXTRACELULARES – EXOSSOMOS

A comunicação intercelular é uma característica importante nos organismos multicelulares e o mecanismo dessa comunicação é realizado pela transferência de informações que pode ser: i) vertical, ou seja, de geração em geração; ii) ou horizontal, por meio de fatores solúveis ou interação direta, ou ainda pela liberação de vesículas extracelulares que podem atuar em células circunvizinhas ou mesmo distantes.

As vesículas extracelulares (VE) têm recebido uma atenção especial por serem consideradas mediadores da comunicação célula-célula. Sua composição está intimamente

relacionada com a sua célula de origem, tanto seu estado funcional quanto seu estado de diferenciação, contendo receptores de superfície, proteínas de membrana e solúveis, ácidos ribonucleicos (RNA mensageiro, transportador e ribossômico, microRNA, pequenos RNA nucleolares, RNA não codificantes longos, entre outros) (revisado por Konoshenko et al., 2018). São envoltas por uma bicamada lipídica e variam de 20 a 5.000 nm de diâmetro. As VE têm sido isoladas de vários fluidos corporais e podem exercer papel chave na regulação de processos fisiológicos e patológicos. As VE podem ser classificadas de acordo com sua biogênese em três principais classes: microvesículas, corpos apoptóticos e exossomos (Lee et al., 2012).

As microvesículas são formadas pelo brotamento direto da membrana plasmática e variam entre 50 e 1.000 nm de diâmetro (revisado por Konoshenko et al., 2018). Os corpos apoptóticos variam de 500 a 2.000 nm de diâmetro e são liberados da célula durante os estágios tardios da morte celular programada (Stolzinger & Grune, 2004). Dentre as VE, os exossomos são as melhores caracterizadas e nos últimos anos tem recebido atenção especial por seu papel em diversas funções celulares e estados de doença. Além disso, trabalhos caracterizam os exossomos como potenciais biomarcadores para diversas doenças, apresentando um interesse para diagnósticos não invasivos ou minimamente invasivos, utilidade em prognósticos e como agentes terapêuticos em vários processos patológicos.

Os exossomos são uma população de vesículas homogêneas, variando de 40 a 150 nm de diâmetro e de 1,13 a 1,19 g/mL de densidade em sucrose. São formados por invaginação em compartimentos internos, chamados de corpos multivesiculares (CMV) ou endossomos tardios que se fundem, então, com a membrana plasmática liberando seu conteúdo, os exossomos (Record et al., 2011; Mayers & Audhya, 2012; Mathivan et al., 2012). De acordo com a literatura, estas VE contêm apresentam proteínas específicas em sua composição, como proteínas da família das tetraspaninas (CD63, CD9, CD81 e CD82),

flotilina, TSG101, Alix e proteínas de choque térmico (HSP60, HSP70, HSPA5, CCT e HSP90) (revisado por Konoshenko et al., 2018).

Figura 2. Via de biogênese de microvesículas e exossomos.

As microvesículas são formadas por brotamento direto da membrana plasmática. Os exossomos são formados por invaginação de endossomos primários, chamados de corpos multivesiculares (CMV) ou endossomos tardios que fundem-se, então, com a membrana plasmática liberando seu conteúdo, os exossomos (modificado de Raposo e Stovoorgel, 2013).

Os exossomos são naturalmente por diversos tipos celulares de todos os tecidos e órgãos, tanto em estado fisiológico quanto patológico, incluindo células-tronco, células neuronais, células tumorais entre outros tipos, e refletem o conteúdo da célula de origem (Simpson et al., 2008). Além disso, os exossomos podem ser encontrados naturalmente na maioria dos fluidos biológicos, como sangue, urina, leite materno, fluido cérebro espinhal e

líquido ascítico (revisado por Konoshenko et al., 2018). Os exossomos secretados podem interagir com outras células de várias formas, direta, resultando na fusão ou endocitose da VE, ou indiretamente, pela ligação com um receptor celular (Janowska-Wieczorek et al., 2001; Gasser & Schifferli, 2004). Um grande avanço no campo de pesquisa dos exossomos foi a descoberta de que estas VE podem transportar proteínas, lipídios e RNA bioativos que podem alterar o fenótipo e a função das células receptoras, indicando um papel importante em vários processos biológicos (Bang & Thum, 2012).

Essas pequenas VE participam na plasticidade neuronal, facilitando a formação de circuitos neuronais (Fauré et al., 2006; Lachenal et al., 2011) e no recrutamento de fatores que promovem a coagulação sanguínea (Wolf, 1967). Além disso, os exossomos participam em processos patológicos como progressão tumoral e metástase (Skog et al., 2008; Yang et al., 2011), disseminação viral (Fackler e Peterlin, 2000; Mack et al., 2000) e doenças neurodegenerativas (Rajendran et al., 2006; Vingtdoux et al., 2007; Sharples et al., 2008; Saman et al., 2012).

Além disso, as VE estão sendo estudadas como facilitadores da resposta imunológica (Thery et al., 2009) e seu papel com apresentação de antígeno tem sido bem documentado (Thery et al., 2002). Estas vesículas podem mediar a ativação ou supressão da resposta imunológica e direcionar a quadros de inflamação, autoimunidade e patologias de doenças infecciosas. Os exossomos, por exemplo, carregam importantes moléculas do sistema imunológico, como complexo de histocompatibilidade maior classe II, moléculas de adesão intercelular 1, entre outras, atuando em vários processos imunológicos, como ativação de linfócitos T (Sprent, 2005; Skokos, 2001), indução de tolerância (Karlsson, 2001) e maturação das células dendríticas (Skokos et al., 2003), que participam nos processos de resposta imunológica. Ainda, os exossomos participam no processo de apoptose e proliferação celular de células do sistema imunológico (Janowska-Wieczorek et al., 2005) Além disso, os

exossomos podem transferir antígenos para células apresentadoras de antígenos desencadeando uma resposta imunológica específica para o agente, tanto tumoral quanto infeccioso, podendo ter um papel importante em aplicações terapêuticas. No caso de infecções virais, os exossomos também podem transmitir ácidos nucleicos, incluindo RNA/microRNA/proteínas virais, caso a célula de origem esteja infectada, a múltiplos sítios anatômicos (Subra et al., 2010), direcionando a resposta imunológica a estes sítios.

7. OS EXOSSOMOS E AS INFECÇÕES VIRAIS

O campo de pesquisa envolvendo os exossomos e as infecção virais é bem explorado e diversos estudos tem sido realizados para caracterização destas vesículas quanto ao conteúdo e a participação destas nos processos de patogênese da infecção viral e na resposta imunológica do hospedeiro. Diversos autores já demonstraram que após uma infecção ou outras condições de ativação celular, as células secretam vesículas altamente específicas e condizentes com a patologia relacionada (revisado por Konoshenko et al., 2018).

Uma vez que a produção de exossomos pela célula é dependente de seu estado funcional, é coerente a suposição de que os vírus modifiquem a via de secreção dos exossomos e que ocorra também alteração do conteúdo destes. Nas infecções virais, os exossomos podem contribuir em dois principais processos: comunicação intercelular participando da patogênese da infecção e modulação da resposta imunológica do hospedeiro. De fato, os estudos têm demonstrado que células infectadas por vírus de várias famílias, como vírus Epstein-Barr - EBV (Pegtel et al., 2010), o herpesvírus humano 8 (HHV-8 ou vírus do sarcoma Kaposi) (Meckes et al., 2013) e HIV (Ali et al., 2010; Campbel et al., 2012) alteram a composição de RNA, proteínas e lipídios dos exossomos. Esta alteração confere novas funcionalidades aos exossomos, como imunomodulação, aumento da infectividade e indução

da doença associada. Vários estudos têm demonstrado que a imunomodulação é o primeiro processo celular afetado pelas mudanças induzidas por vírus nos exossomos (revisado por Flemming et al., 2014).

A maior parte dos estudos de imunomodulação são focados na alteração dos exossomos que é benéfica para o vírus, entretanto, essas mudanças podem também favorecer o sistema imunológico do hospedeiro na defesa contra a infecção viral. Um exemplo disso é o aumento da produção de interferon alfa (IFN- α) pelas células dendríticas plasmocitóides por meio da interação com exossomos provenientes de uma linhagem celular de hepatocarcinoma infectada pelo vírus da hepatite C - HCV (Dreux et al., 2012). Este resultado demonstra uma estratégia de defesa do organismo, ativando a resposta imunológica inata do hospedeiro.

Além disso, um estudo demonstrou que os vírus podem utilizar a via de secreção dos exossomos para disseminar a infecção e evadir do sistema imunológico do hospedeiro. Estudos demonstraram que os exossomos isolados de uma linhagem celular de hepatoma infectada pelo HCV contém o genoma completo do vírus e são capazes de transmitir a infecção para células da mesma linhagem não infectada, independente da participação de células infectadas (Longatti et al., 2015; Ramakrishnaiah et al., 2013). Ainda, este tipo de transmissão viral é parcialmente resistente à neutralização por anticorpos garantindo um eficiente mecanismo de evasão do sistema imunológico (Ramakrishnaiah et al., 2013).

Um estudo realizado em linfócitos B infectados por HHV-8 e/ou EBV identificou mais de 340 proteínas que são incorporadas aos exossomos especificamente quando ocorre infecção por estes vírus (Meckes et al., 2013). Além disso, estudos relataram um mecanismo de imunossupressão produzido pelo EBV mediado por EV. Exossomos produzidos durante a infecção pelo EBV, contendo LMP-1 e galectina 9, reduzem a proliferação e aumentam a apoptose de linfócitos T CD4⁺. (Keryer-Bibens et al., 2006; Klibi et al., 2009).

Na infecção pelo HIV-1, os exossomos provenientes de células infectadas são capazes de transportar proteínas regulatórias virais, como a proteína Nef (Campbel et al., 2012) e o RNA do elemento de resposta transativadora (TAR) (Narayanan et al., 2013; Sampey et al., 2016). A captação deste exossomos contendo TAR pode inibir a apoptose e sugere-se que este processo tenha um papel na manutenção da infecção pelo HIV (revisado por Anderson et al., 2018). Ainda, exossomos contendo TAR estimulam a produção de citocinas próinflamatórias pelas células por meio da ativação da via de NFkB (Sampey et al., 2016). Por outro lado, a incorporação de exossomos contendo Nef levam a um aumento na susceptibilidade celular à infecção pelo HIV (revisado por Anderson et al., 2018). Além disso, foi demonstrado que Nef exossomal aumenta a apoptose de linfócitos T CD4⁺ *in vitro*, o que pode contribuir com a depleção destas células na patogênese da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Lenassi et al., 2010).

Na infecção pelo HTLV-1 foi demonstrado que os exossomos secretados por de células infectadas por este vírus contém moléculas virais como proteína e RNA mensageiro (RNAm). Tanto as linhagens celulares quanto as células primárias de pacientes HAM/TSP produzem exossomos contendo proteína e RNAm de *tax* e/ou *hbx* (revisado por Anderson et al., 2018). Além disso, exossomos isolados de fluido cérebro-espinhal de pacientes HAM/TS também apresentavam Tax em seu conteúdo (revisado por Anderson et al., 2018). Evidências demonstram que estes exossomos contendo antígenos virais do HTLV-1 podem estar associados a citotoxicidade. Por um lado, os exossomos contendo Tax aumentam a lise celular por linfócitos T citotóxicos de células expostas a estes e, por outro lado, estes exossomos aumentam a sobrevivência de linhagem celular de linfócito T citotóxico dependente de IL-2 (revisado por Anderson et al., 2018).

No geral, os estudos envolvendo os exossomos e as infecções virais estão bem avançadas, focando principalmente no conteúdo vesicular associado à patogênese da infecção.

Os estudos relacionados à infecção pelo HTLV-1 estão apenas no início e poucos são os dados disponíveis referentes a este assunto. Dessa forma, tornam-se necessários esforços para que esse mecanismo, que se tem mostrado importante na patogênese de outras infecções virais, seja investigado na infecção por este retrovírus.

Objetivos

II. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Isolar, caracterizar e avaliar *in vitro* o potencial imunomodulatório dos exossomos derivados de células infectadas pelo HTLV-1.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar os exossomos de células infectadas pelo HTLV-1;
- Caracterizar os exossomos quanto à morfologia, tamanho e marcadores específicos;
- Detectar moléculas virais nos exossomos;
- Avaliar o potencial de transferência do conteúdo exossomal para células receptoras;
- Avaliar o efeito imunomodulatório dos exossomos sobre linfócitos T.

Metodologia

III. METODOLOGIA

Figura 3. Desenho esquemático da estratégia do estudo.

1. LINHAGEM CELULAR

A linhagem celular C8166 (ECACC 88051601) é uma linhagem produzida por meio da fusão de células primárias de sangue de cordão umbilical com células de uma linhagem celular produtora de HTLV-1 obtidas de paciente ATLL. A linhagem obtida de C8166 contém um genoma defectivo do HTLV-1, que expressa o gene *tax* (*p40*) e não expressa os genes de proteínas estruturais, transcriptase reversa e, consequentemente, não produz partículas virais.

Esta linhagem celular foi empregada para produzir as vesículas extracelulares utilizados neste estudo.

As células foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) completo suplementado com 10% de soro bovino fetal depletado de exossomos (Exofree-SBF) em estufa com atmosfera a 5% de CO₂ e temperatura a 37 °C.

O Exofree-SBF foi produzido a partir de soro bovino fetal (Hyclone) pela centrifugação a $100.000 \times g$ por 16 horas a 4 °C e, ao final, o sobrenadante obtido foi considerado Exofree-SBF.

2. CASUÍSTICA

Foram utilizadas células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis nos ensaios de potencial imunoestimulatório dos exossomos.

Para tanto, foram selecionados voluntários saudáveis, com idade variando entre 25 e 30 anos de idade, divididos em dois homens e duas mulheres, apresentando testes negativos para doenças infecciosas (HIV, HCV, HBV, HTLV, Sífilis e Chagas) e não apresentando sintomatologia de doenças inflamatórias. A coleta foi realizada no Hemocentro de Ribeirão Preto do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCFMRP/USP, sob número de processo 3437/2015 (Anexo I). Todos os indivíduos foram informados quanto ao procedimento de coleta e as amostras foram utilizadas somente mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II).

3. ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS

As vesículas extracelulares foram isoladas a partir de 180 mL de sobrenadante da cultura da linhagem celular C8166 por centrifugação diferencial seguida de

ultracentrifugação. Inicialmente, o sobrenadante foi submetido a uma centrifugação de $300 \times g$ por 10 minutos para remoção de células vivas, seguida por outra centrifugação a $2.000 \times g$ por 10 minutos para remoção de células mortas. Em seguida, o sobrenadante obtido foi submetido a uma centrifugação a $10.000 \times g$ por 30 minutos para remoção de fragmentos celulares e, então, filtrado por uma membrana de poro de $0,22 \mu m$. O sobrenadante coletado foi centrifugado a $100.000 \times g$ por 70 minutos a fim de se obter o *pellet* de exossomos. Os exossomos sedimentados foram lavados e ressuspensos em 1X PBS. Este passo foi seguido por uma nova centrifugação a $100.000 \times g$ por 70 minutos e, ao final, o *pellet* de VE foi ressuspensionado em volume apropriado de PBS 1X e estocado a $4^\circ C$ (para utilização até 24 horas) para procedimentos posteriores.

Todos os passos de centrifugação foram realizados a $4^\circ C$ e as rotações de ultracentrifugação foram realizadas em rotor *swing bucket* – SW28 – no equipamento *Beckman Optima XL-100K Ultracentrifuge* (Beckman).

4. CARACTERIZAÇÃO DOS EXOSSOMOS

4.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os *pellets* de exossomos recém-isolados foram fixados em tampão fosfato contendo 2% de glutaraldeído e 4% paraformaldeído a $4^\circ C$ por 2 horas. As amostras foram centrifugadas a $16.500 \times g$ por 30 minutos e o *pellet* obtido foi ressuspensionado em PBS 1X e adicionado aos *Formvar/carbon-coated electron microscopy grids* e visualizado por contraste negativo.

As amostras foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão JEM-100CX II (Jeol) equipado com a câmera digital Hamamatsu ORCA-HR a uma magnitude de 200.000x. As imagens foram analisadas com auxílio do software ImageJ (NIH).

4.2.

Foi utilizada a técnica de espalhamento dinâmico da luz para a análise do diâmetro médio e distribuição de tamanho das partículas. Os exossomos isolados diluídos 1:1000 em água Mili-Q (v/v) foram submetidos às análises no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). As amostras foram colocadas em cubetas de poliestireno de 1 cm de caminho óptico e as medições foram realizadas a 25°C. O equipamento possui um laser de HeNe de 4 mW operando num comprimento de onda de 633 nm e realiza as medições não invasivas por retroespalhamento de luz sob um ângulo de detecção de 173°. As análises foram realizadas em triplicata.

A distribuição de tamanho das partículas foi avaliada por determinação do índice de polidispersão (PDI), que é uma medida adimensional da amplitude de distribuição das partículas e varia de 0 a 1. Quanto mais próximo esse valor de zero, mais homogêneo é o tamanho das partículas.

4.3. Análise de rastreamento de nanopartículas (do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis – NTA*)

Os exossomos foram avaliados quanto à concentração e ao tamanho médio pela técnica de NTA utilizando o equipamento *Nanosight NS300* (Malvern) com um comprimento de onda de 405 nm e analisadas com o auxílio do software *NanoSight NTA Software v3.1*. As amostras foram injetadas na câmara de amostra com seringas estéreis até o líquido atingir a ponta do bocal. Todas as medições foram executadas a 25 °C e os exossomos foram diluídos a 1:4000 (v/v) em PBS 1X. Foram adquiridos cinco vídeos de 30 segundos por amostra, ao nível 10 da câmera e limite de detecção de 3. O *blur* (projetado para eliminar o ruído), a faixa de comprimento mínimo e o tamanho mínimo de partículas esperado foram definidos automaticamente pelo software.

As barras de erro exibidas nos gráficos foram obtidas pelo desvio padrão (SD) das diferentes medidas de cada amostra. O tamanho médio e os valores de SD obtidos pelo software correspondem à valores aritméticos calculados pelos tamanhos de todas as partículas analisadas pelo software.

4.4. Análise de marcadores proteicos específicos de exossomos

4.4.1. Extração de proteínas

As proteínas exossomais foram extraídas utilizando-se o tampão de extração de proteínas RIPA (Cell Signaling) adicionado de inibidores de proteases e fosfatases (Roche) a uma concentração de 3:1. A adição do tampão juntamente com os inibidores permite a lise da membrana do exossomo e solubilização proteica, evitando a degradação das mesmas e mantendo sua atividade biológica. Ao *pellet* de exossomos foram adicionados 75 µL da solução de tampão RIPA adicionado de inibidores e os mesmos foram congelados a -80°C overnight.

Priori ao uso, a mistura foi descongelada e sonicada três vezes durante 5 minutos intercalados com 5 minutos de gelo. As amostras foram centrifugadas a 18.000 x g durante 30 minutos. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e quantificado.

4.4.2. Quantificação de proteínas

A quantificação das proteínas totais foi realizada em microplacas utilizando o kit *BCA Protein Assay Kit®* (Thermo Scientific), conforme especificações do fabricante. Para a construção da curva-padrão realizou-se diluição seriada a partir de uma solução-padrão fornecida com o kit, composta por BSA 2 mg/mL. Foram utilizadas as seguintes concentrações: 2 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,0625 mg/mL.

As amostras foram pipetadas em diluições que variavam de 1:1 a 1:100, dependendo do *pellet* obtido após a ultracentrifugação, totalizando 15 μ L por poço. A água que fora utilizada nas diluições foi utilizada como branco. Em seguida, foram adicionados 200 μ L da mistura de reagentes A e B (do kit) em cada poço. A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos e seguida pela leitura a 562 nm em leitor de microplacas, utilizando o software SoftMax (Molecular Devices).

4.4.3. Western Blotting

Um total de 30 μ g proteínas foram solubilizadas em Tampão *Buffer NuPAGE*® LDS (Life Technologies) e aplicadas em gel de poliacrilamida SDS Tris-Glicina 8%. Foi realizada uma corrida a 100 V nos primeiros 30 minutos e 20 mA até o final da eletroforese.

A transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de PVDF Hybond-P® (GE Healthcare) ativada em equipamento de transferência semi-seco (Bio-Rad Laboratories) por 30 minutos a 25 V. Em seguida, foi realizado o bloqueio da membrana com leite em pó desnatado 5% em TBS-T (20 mM Tris pH 7.5; 150 mM NaCl; 0.1% [v/v] Tween 20), durante uma hora em agitação constante.

Ao final do bloqueio, a membrana foi sucessivamente lavada com TBS-T e foi realizada a incubação da mesma, *overnight* a 4 °C, com anticorpos primários diluídos 1:400 em 1% BSA/TBS-T: *rabbit* anti-CD63 (SC-15363), *goat* anti-Alix (SC-42267) and *goat* anti-citocromo C (SC-8385). No dia seguinte, a membrana foi lavada sucessivamente com TBS-T, para retirada de ligações inespecíficas, e incubada com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (HRP) apropriados diluídos 1:3000 em 1% BSA/TBS-T por duas horas a temperatura ambiente.

Para visualização da ligação dos anticorpos às proteínas específicas, foi utilizado kit *Clarity*™ ECL Western Blotting Substrate (Bio-Rad Laboratories), conforme instruções do

fabricante. A visualização do sinal de quimiofluorescência foi realizada no fotodocumentador *BioRad ChemiDocTM MP Imaging System* (Bio-Rad Laboratories).

5. ANÁLISE DO CONTEÚDO DOS EXOSSOMOS

5.1. Detecção de RNA viral

5.1.1. Extração de RNA exossomal

Para extração de RNA nas vesículas, foi utilizado o kit QIAamp Viral RNA (Qiagen), seguindo-se as instruções do fabricante. Foram utilizados 140 µL do *pellet* de exossomos obtido após a ultracentrifugação ressuspendido em PBS 1X. Ao final, o RNA foi eluído em 30 µL de água nuclease-*free* e armazenado a -80 °C. O RNA obtido foi quantificado por leitura em espectrofotômetro NanoDrop (ThermoFischer).

5.1.2. Transcrição de RNA em cDNA

Um total de 500 ng a 1 µg de RNA total foi transcrito em cDNA utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Life Biosciences), utilizando *primers* específicos em cada reação (Tabela 1). A reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante e incubada a 25 °C por 10 minutos seguido de 37 °C por 2 horas.

Tabela 1. Sequência de *primers* utilizados para reações de transcrição reversa.

Gene	Sequência (5'-3')
<i>Tax</i>	GAGAACTTACCCATGGTGTGG
<i>ACTB</i>	CCAGGGCAGTGATCTCCTTCT

5.1.3. Detecção do gene *tax* por PCR em tempo real

A detecção dos genes foi realizada por PCR em tempo real utilizando os kits *Taqman® Universal PCR Master Mix* (Life Biosciences) de acordo com as instruções do fabricante. A mistura de reação foi constituída por: 5 µl de reagente *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (2X); 0,5 µl de de cada primer e sonda (20X); 0,5 µl de água reagente estéril Tipo I e cDNA obtido no item anterior, diluído 1:10 (v/v). Foi utilizado o gene *ACTB* como controle positivo da reação.

A reação foi submetida aos ciclos de amplificação: um ciclo de 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos/60°C por 1 minuto. Todas as reações foram testadas em duplicatas. Foram utilizados *primers* específicos para o gene *tax*, listados na Tabela 2. Para amplificação da actina, foi utilizado a sonda *Human ACTB (Beta Actin) Endogenous Control* (Applied Biosystems).

Tabela 2. Sequência de *primers* e sonda utilizados para reações de PCR em tempo real.

Gene	Primer	Sequência (5'-3')
<i>Tax</i>	F	ATCCCGTGGAGACTCCTCAA
	R	GAGAACTTACCCATGGTGTGG
	Sonda	FAM-AGCTGCATGCCCAAGA-MGB

6. ENSAIO DO IMUNOESTIMULAÇÃO

6.1. Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis incluídos no estudo foram isoladas a partir de 40 mL de sangue total coletados em tubos

contendo heparina sódica, utilizando-se o método de gradiente de densidade *Ficoll-Paque™ PLUS GE* (GE Healthcare). As amostras foram centrifugadas a 200 x g durante 10 minutos e o plasma foi removido. Após a remoção do plasma, as amostras foram diluídas 1:1 (v/v) em PBS 1X pH 7,5 em tubos propileno de 50 mL. Em seguida, foram adicionados, cuidadosamente, 15 mL de Ficoll-Paque™ sob o sangue. Os tubos foram centrifugados a 500 x g durante 30 minutos e à temperatura ambiente para a obtenção da camada de PBMC. O anel formado na interface plasma-Ficoll Paque™, que continha as PBMC, foi cuidadosamente coletado, transferido para um novo tubo e lavado duas vezes com 30 mL de PBS 1X gelado por centrifugação a 200 x g durante 10 minutos. O *pellet* de PBMC foi ressuspensionado em 1 mL de PBS (1X) e contado em câmara de Neubauer utilizando corante Turk.

6.2. Ensaio de imunoestimulação das PBMC por exossomos

Um total de 1×10^6 PBMC foram cultivadas em placas de seis poços e volume final de 1,5 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com soro bovino fetal depletado de exossomos (ver item 1) e expostas aos exossomos isolados da linhagem celular C8166 durante 72 horas. A preparação de exossomos foi normalizada pela quantidade de proteína total e foi adicionada em cada poço a uma concentração final de 50 µg/mL.

As células foram tratadas com 10 µg/mL Brefeldina A (BFA, Sigma-Aldrich) para inibir o transporte intracelular e permitir o acúmulo das citocinas no interior da célula e, dessa forma, possibilitar a quantificação destas por meio da técnica de citometria de fluxo. Além disso, foi utilizada a combinação de 50 ng/mL de *phorbol-12-myristate-13-acetate* (PMA, Sigma-Aldrich) and 1 µg/mL ionomicina (ION, Fluka) a fim de estimular a produção de citocinas e, assim, ser utilizado como controle positivo. Os dois tratamentos, tanto com BFA e PMA/ION foram realizados seis horas antes da marcação das citocinas para o procedimento

de citometria de fluxo. As PBMC que não foram estimuladas ou que foram tratadas somente com BFA foram utilizadas como controle negativo.

7. AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA DO RNA VIRAL TAX

Findado o período de cultura das PBMC em contato com os exossomos, as células foram lavadas com PBS 1X e o RNA das mesmas foi extraído a fim de verificar a transferência do conteúdo viral (gene *tax*) dos exossomos para as células PBMC.

O RNA celular foi extraído pela metodologia do Trizol[®] (Life Technologies). Às células isoladas, foi adicionado 1 mL de Trizol[®] reagente e 100 µg de glicogênio (USB). A mistura foi homogeneizada e foi incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente para dissociação nucleoproteica. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck) seguido por agitação em vórtex durante 15 segundos e incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 12.000 x g a 4°C. Nesta etapa, a mistura é separada em uma fase inferior de coloração rosa, a fase fenol-clorofórmio; uma interface; e uma fase aquosa. O RNA permanece na fase aquosa, que foi transferida para um novo tubo.

O RNA foi precipitado com adição de 500 µL de isopropanol gelado (Merck) sobre a fase aquosa e posterior incubação a -80°C durante 2 horas. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12.000 x g durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70% (v/v) e centrifugado a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Após a secagem, o RNA foi eluído em 20 µL de água nuclease *free*, e estocado a -80°C.

Por fim, o RNA foi quantificado e avaliado quanto à sua 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 desse RNA total, foi sintetizado o cDNA de acordo com o item 5.1.2 e o gene *tax* foi detectado de acordo com o item 5.1.3.

8. QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS NAS PBMC

A quantificação de citocinas nas PBMC foi realizada pela técnica de citometria de fluxo, utilizando o citômetro FACSCalibur (Becton & Dickinson).

Após o período de estimulação, as células PBMC tratadas e não tratadas foram lavadas com PBS 1X e distribuídas em tubos de poliestireno específicos para a técnica. Adicionou-se 5 µL de anticorpo de marcação de superfície celular conjugados com fluorocromos: anti-CD3 (FITC), anti-CD3 (PE), anti-CD4 (PerCP), anti-CD8 (APC) e anti-CD69 (PE). Foi incluído também um tubo com isotipos controles. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente e protegidas da luz por 15 minutos. Ao final da incubação, as amostras foram lavadas com 200 µL de PBS 1X para retirada das ligações inespecíficas por centrifugação a 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e às células foi adicionado 1 mL de *BD FACSTM Lysing Solution* (BD Biosciences) para fixação das amostras. As amostras foram então incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz. As células foram novamente lavadas e adicionou-se 300 µL de *BD FACSTM Permeabilizing Solution* (BD Biosciences) para permeabilização da membrana celular. As células novamente foram incubadas nas mesmas condições e, em seguida, adicionou-se os anticorpos conjugados com fluorocromos de marcação intracelular: anti-IFN- γ (FITC), anti-TNF- α (PE), anti-IL-4 (PE), anti-Granzima B (FITC) and anti-Perforina (PE). As células foram lavadas com PBS 1X e foi realizada a leitura em citômetro de fluxo. Foram coletados 10.000 eventos por amostra e análise foi realizada pelo *software BD CellQuest Pro* (BD Biosciences) normalizando-se a fluorescência pelos isotipos controles.

9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as análises estatísticas dos resultados, os dados foram apresentados como media $\pm$ SD. O teste de Friedman, que é um teste não paramétrico, foi utilizado para comparações múltiplas pareadas, seguido pelo teste de Dunn. Todas as análises foram realizadas utilizando o *GraphPad Prism 7* (GraphPad Software Inc.).

Resultados

IV. RESULTADOS

1. ISOLAMENTO DE EXOSSOMOS

Os exossomos foram isolados pelo método de centrifugação diferencial e ultracentrifugação a partir de sobrenadante de cultura da linhagem celular C8166, que é derivada de células infectadas pelo HTLV-1, entretanto possui DNA defectivo e, por isso, expressa somente o gene viral *tax* e não produz partículas virais. Esta estratégia evita a etapa de separação de partículas virais das amostras de exossomos.

Os exossomos isolados foram caracterizados por morfologia, tamanho de partículas, concentração e presença de marcadores proteicos específicos estabelecidos e, em seguida, foram utilizados para ensaios de imunoestimulação, no qual avaliou-se a capacidade dos exossomos transferirem seu conteúdo a células receptoras (PBMC) e o efeito deste conteúdo nestas células.

2. VISUALIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DOS EXOSSOMOS

A microscopia eletrônica de transmissão é considerada uma ferramenta fundamental na caracterização da morfologia dos exossomos. Logo, esta técnica foi utilizada para caracterizar os exossomos isolados de sobrenadante de cultura de células da linhagem C8166.

Os exossomos foram observados em microscópio eletrônico de transmissão por contraste negativo. As imagens obtidas demonstram que os exossomos possuem forma arredondado e “*cup-shaped*” (centro côncavo). Além disso, os exossomos observados apresentavam, no geral, tamanhos homogêneos (Figura 4).

Figura 4. Imagens representativas dos exossomos obtidas por microscopia eletrônica de transmissão e visualizadas por contraste negativo.

Os exossomos foram isolados da linhagem celular C8166 por centrifugação diferencial e ultracentrifugação. As imagens apresentam diferentes magnitudes de (A) 20.000X, (B) 50.000X, (C) 100.000X e (D) 200.000X. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão JEM-100CX II equipado com câmera digital Hamamatsu ORCA-HR de 200.000x de aumento. As imagens foram analisadas pelo software ImageJ (NIH) e as barras de escala podem ser visualizadas nas mesmas.

3. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DOS EXOSSOMOS

Os exossomos isolados a partir das células da linhagem C8166 por ultracentrifugação foram avaliados quanto ao seu diâmetro médio e polidispersividade pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS - do inglês, *Dynamic Light Scattering*). O grau de polidispersão indica a homogeneidade da amostra e quanto mais próximo o valor de zero mais homogênea a amostra se encontra.

Os exossomos isolados foram analisados quanto ao grau de dispersão e apresentaram tamanho de partículas médio de $149,6 \pm 23,91$ nm, variando entre 105,7 nm a 164,2 nm (Figura 5). O índice de polidispersividade (PdI) obtido da amostra foi de 0,32, demonstrando que a distribuição da solução de exossomos analisada foi homogênea.

Figura 5. Tamanho e distribuição de tamanho dos exossomos avaliados por Dynamic Light Scattering (DLS).

A

Size d.nm	Mean Intensity Percent	Std Dev Intensity Percent	Size d.nm	Mean Intensity Percent	Std Dev Intensity Percent	Size d.nm	Mean Intensity Percent	Std Dev Intensity Percent
0,4000	0,0		5,615	0,0		78,82	0,0	
0,4632	0,0		6,503	0,0		91,28	0,0	
0,5365	0,0		7,531	0,0		105,7	8,5	
0,6213	0,0		8,721	0,0		122,4	26,1	
0,7195	0,0		10,10	0,0		141,8	34,4	
0,8332	0,0		11,70	0,0		164,2	24,4	
0,9649	0,0		13,54	0,0		190,1	6,6	
1,117	0,0		15,69	0,0		220,2	0,0	
1,294	0,0		18,17	0,0		255,0	0,0	
1,499	0,0		21,04	0,0		295,3	0,0	
1,736	0,0		24,36	0,0		342,0	0,0	
2,010	0,0		28,21	0,0		396,1	0,0	
2,328	0,0		32,67	0,0		458,7	0,0	
2,696	0,0		37,84	0,0		531,2	0,0	
3,122	0,0		43,82	0,0		615,1	0,0	
3,615	0,0		50,75	0,0		712,4	0,0	
4,187	0,0		58,77	0,0		825,0	0,0	
4,849	0,0		68,06	0,0		955,4	0,0	

B

(A) Tabela de distribuição de tamanho (105,7 nm a 190,1 nm) e (B) Tamanho de partículas ($149,6 \pm 23,91$ nm) gerados pelo equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern). A tabela e o gráfico demonstram a intensidade de porcentagem de cada tamanho detectado pelo equipamento.

4. TAMANHO E CONCENTRAÇÃO DOS EXOSSOMOS

Uma outra técnica para análise do tamanho dos exossomos foi o rastreamento de partículas (NTA, do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis*) que permite a análise individual de cada partícula por vídeo. Cada amostra foi lida cinco vezes pelo aparelho e os valores obtidos foram expressos em moda. Por meio desta técnica, foi obtido um tamanho de exossomos de $138 \pm 5,9$ nm (Figura 6) e uma concentração média de $1,25 \times 10^{-9}$ partículas/mL na solução.

Figura 6. Tamanho dos exossomos avaliados por *Nanoparticle Tracking Analyses* (NTA).

As amostras de exossomos foram analisadas no aparelho Nanosight NS300 (Malvern). O gráfico representativo apresenta a distribuição do tamanho das partículas na amostra de exossomos em escala de nanômetro pela concentração em partículas/mL.

5. DETECÇÃO DE MARCADORES PROTEICOS ESPECÍFICOS DE EXOSSOMOS

Em continuidade ao processo de caracterização dos exossomos isolados, as proteínas transmembrana CD63 e citosólica Alix, descritas como marcadores específicos para caracterização de exossomos, foram avaliadas por *Western Blotting*. Além disso, a fim de descartar a contaminação por debris celulares e outras vesículas de origem não endossomal, foi avaliada a proteína citocromo C. Logo, as proteínas dos exossomos foram extraídas e analisadas.

Pela análise da imagem obtida após o processo de *Western Blotting*, observou-se que o preparado de exossomos apresentava as proteínas CD63 e Alix, caracterizando as vesículas isoladas como exossomos, e ausência de citocromo C, indicando que os exossomos não estavam contaminados com debris celulares (Figura 7).

Figura 7. Expressão de Alix, CD63 e citocromo C em exossomos isolados de células da linhagem C8166.

Foram analisadas 30 µg de proteína total em gel de poliacrilamida 8% quanto à expressão de marcadores específicos de exossomos, Alix (100 kDa) e CD63 (30 a 60 kDa). A ausência de citocromo C (15 kDa) indica a baixa contaminação do isolado. O marcador de peso molecular, assim como a indicação dos pesos, está indicado à esquerda enquanto que a amostra está indicada à direita.

6. DETECÇÃO DO RNA VIRAL TAX NOS EXOSSOMOS

A linhagem celular C8166 é uma linhagem derivada de células infectadas pelo HTLV-1, entretanto, por apresentar um material genético defectivo, expressa somente o gene viral *Tax*. Desta forma, a fim de avaliar se os exossomos carregavam moléculas virais, foi analisada a presença deste gene pela detecção do RNA mensageiro (RNAm) derivado do gene *tax* nos exossomos isolados das células C8166.

Diferentemente do que ocorre com marcadores proteicos que são listados como específicos de exossomos, atualmente ainda não existe um RNA específico de exossomos. Assim, como controle positivo da reação, foi utilizado o gene da actina neste estudo.

Foi extraído o RNA total dos exossomos e realizado uma PCR em tempo real para detecção destes RNA. Pela análise do gráfico de amplificação (Figura 8), observou-se que os exossomos isolados de células C8166 carregam o RNAm do gene *tax* em seu conteúdo, assim como o RNAm do gene da actina.

Figura 8. Amplificação dos RNAm de actina e *tax* nos exossomos.

O RNA foi extraído dos exossomos isolados da linhagem C8166, derivada de células infectadas pelo HTLV-1, foram testados quanto à presença dos RNAm de actina e *tax*. A figura demonstra a curva de amplificação de actina e *tax*, presentes no conteúdo exossomal.

7. ENSAIOS DE IMUNOESTIMULAÇÃO

A fim de se avaliar o papel dos exossomos isolados de células infectadas pelo HTLV-1, os mesmos foram adicionados às culturas de PBMC primárias, isoladas de indivíduos saudáveis não infectados pelo HTLV-1, portanto, negativas para o gene *tax* viral.

As células PBMC foram expostas aos exossomos durante 72 horas e ao fim deste período, foi avaliado o potencial de transferência do conteúdo dos exossomos para estas células bem como o efeito dos mesmos no que se refere à modulação de citocinas inflamatórias.

7.1. Avaliação da transferência do conteúdo exossomal para as PBMC

Com o intuito de se avaliar se os exossomos isolados do sobrenadante de cultura da linhagem C8166 eram capazes de transferir o conteúdo exossomal para as células PBMC, foi avaliado o RNA viral *tax* nestas células após o cultivo das PBMC com exossomos. Como o RNA viral é detectado somente em indivíduos infectados, as células PBMC isoladas de indivíduos não infectados não apresentavam esse RNA. Após 72 horas de exposição das células PBMC aos exossomos, o RNA viral *tax* foi detectado nas PBMC, indicando a possível transferência do conteúdo dos exossomos às PBMC (Figura 9). Desta forma, concluímos que os exossomos podem transportar e transferir moléculas virais à célula-alvo. O gene da actina foi utilizado como controle positivo da reação.

Figura 9. Amplificação dos RNAm de actina e *tax* nas PBMC.

As células PBMC de indivíduos saudáveis expostas aos exossomos por 72 horas. Após este período, o RNA total das células foi extraído e testado quanto à presença dos RNAm de actina e *tax*. A figura demonstra a curva de amplificação de actina e *tax*.

7.2. Quantificação de citocinas

Para testar a o efeito biológico dos exossomos isolados de células produtoras de Tax na indução de resposta imunológica inflamatória, as PBMC de indivíduos saudáveis foram expostas à estes exossomos por 72 horas. Em seguida, a expressão de citocina foi avaliada por marcação intracelular utilizando a técnica de citometria de fluxo.

Foram avaliadas citocinas pró-inflamatórias (interferon γ , IFN- γ e fator de necrose tumoral α , TNF- α) e anti-inflamatória (interleucina 4, IL-4) em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e os grânulos citotóxicos perforina e granzima B em linfócitos T CD8⁺.

Foi observado que a produção de IFN- γ pelas PBMC aumentou significativamente após a exposição aos exossomos. Observou-se um aumento no grupo tratado com exossomos, quando comparado com o grupo não tratado, de 11 vezes em linfócitos T CD4⁺ (3.91 ± 4.31 vs. 0.35 ± 0.42) e 13 vezes em linfócitos T CD8⁺ (6.42 ± 4.88 vs. 0.49 ± 0.82) (Figuras 10A e 10B).

Observou-se um aumento na produção de TNF- α de três vezes pelos linfócitos T CD4⁺ (1.02 ± 0.72 vs. 0.36 ± 0.28) e de duas vezes pelos linfócitos T CD8⁺ (0.48 ± 0.33 vs. 0.24 ± 0.38) quando comparados os grupos tratado e não tratado (Figuras 10C e 10D), sem significado estatístico.

Não foram observadas alterações nos níveis de produção de IL-4, perforina e granzima B nas células analisadas (Figuras 10E, 10F, 10G).

Figura 10. Expressão de citocinas por PBMC de indivíduos saudáveis após exposição aos exossomos isolados de células HTLV-1.

= '[[[=

As PBMC foram expostas aos exossomos por 72 horas (Exo). As células não tratadas foram consideradas como controle negativo (Control). As subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foram avaliadas quanto à expressão de IFN- γ , TNF- α , Granzima B, Perforina e IL-4. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ SD. As análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism v.7 utilizando o teste de Friedman seguido pelo teste de Dunn (** $p<0,01$; * $p<0,05$).

Discussão

V. DISCUSSÃO

Em 2014, a Rede Mundial em Vírus (*Global Virus Network*) lançou uma força tarefa para promoção de pesquisa básica, prevenção e tratamento da infecção pelo HTLV-1. Esta força tarefa propõe uma série de ações prioritárias como diretrizes nos estudo da infecção pelo HTLV-1 como a expansão dos estudos epidemiológicos e de pesquisas na área de persistência, replicação e patogênese viral, além da busca por tratamentos efetivos e vacinas profiláticas e terapêuticas (Willems et al., 2016).

Apesar do trabalho acumulado de vários anos em pesquisas em HTLV, o conhecimento adquirido ainda não é suficiente para um tratamento efetivo. Dessa forma, as pesquisas básicas envolvendo persistência e patogênese viral se tornam extremamente importantes. Como metas futuras propostas por esta rede mundial, inclui-se entre outros, a pesquisa envolvendo os genes virais *tax* e *hbx* e o papel da resposta imunológica no controle da infecção (Willems et al., 2016).

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa se empenha em contribuir nas áreas da pesquisa básica e aplicada na infecção pelo HTLV-1. Uma das linhas de pesquisa do nosso grupo é o entendimento dos fatores do hospedeiro que influenciam no desenvolvimento das doenças associadas, principalmente a HAM/TSP. Nesta linha de pesquisa estão incluídos a avaliação de: polimorfismos, como no genes de HLA-G3, perforina, IL-18 (Cilião Alves et al., 2016; Garcia et al., 2013; Rocha-Júnior et al., 2012); microRNA (Otaguiri et al., 2013; Haddad et al., 2011; Haddad et al., 2011b); perfil genético de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ infectados pelo HTLV-1 (Pinto et al., 2013; Malta et al., 2013); e papel de leucotrienos na infecção (Trindade et al., 2012).

Neste estudo, abordamos o papel das vesículas extracelulares. Este tópico ainda foi pouco explorado na infecção pelo HTLV-1 e o seu significado biológico com relação à patogênese da infecção e de desenvolvimento de HAM/TSP ainda não foi estabelecido. O

intuito deste trabalho é contribuir com os estudos de pesquisa básica a fim de se desvendar os mecanismos de patogênese viral e contribuir na resposta à um dos temas propostos pela força tarefa.

Neste trabalho, os exossomos provenientes das células infectadas pelo HTLV-1 foram isolados e mostraram características quanto à morfologia, tamanho e presença de marcadores protéicos condizentes aos relatados na literatura. Foi também detectado o RNAm viral do gene *tax* presente no conteúdo dos exossomos isolados e observou-se que este RNAm viral, *tax*, pode ser transferido dos exossomos para outra célula recipiente, como as células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Por fim, a exposição das PBMC aos exossomos contendo *tax* foi capaz de induzir a produção de citocinas inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α por linfócitos T. Estes resultados sugerem um potencial mecanismo no qual a infecção pelo HTLV-1 poderia induzir uma resposta inflamatória indiretamente, colaborando com uma das hipóteses de patogênese da HAM/TSP.

Os exossomos isolados utilizados neste trabalho foram isolados pela técnica combinada de centrifugação diferencial e ultracentrifugação. Apesar de esta técnica ser a mais utilizada atualmente, um método padrão e validado ainda não foi estabelecido. A combinação de centrifugação diferencial e ultracentrifugação consiste em centrifugações sequenciais na intenção de eliminar *debris* celulares ($300 \times g$ por 10 minutos), grandes vesículas ($2.000 \times g$ por 10 minutos), microvesículas maiores que 150 nm ($10.000 \times g$ por 30 minutos) e, finalmente, obter os exossomos (ultracentrifugação a $100.000 \times g$ por 70 minutos). A lavagem do *pellet* final, que é enriquecido por exossomos, pode reduzir a contaminação por proteínas solúveis.

A padronização do isolamento de exossomos utilizando este método de centrifugação diferencial e ultracentrifugação apresenta algumas desvantagens. A duração de cada centrifugação deve ser otimizada de acordo com o rotor utilizado e com o líquido/fluido no qual os exossomos estão inseridos. Há dois tipos de rotores comumente utilizados: o de

ângulo fixo e o “*swing bucket*”. Uma vez que a taxa de sedimentação das vesículas é dependente de seu tamanho, densidade e caminho a ser percorrido, o tempo de cada centrifugação deve ser cuidadosamente calculado (Livshits et al., 2016). Outro aspecto é que a contaminação do isolado de exossomos com outras pequenas vesículas deve ser considerado. As microvesículas, que são geradas pelo brotamento da membrana celular, apresentam tamanho diverso e podem se sobrepor aos exossomos. Assim, não se pode excluir a possibilidade de que as análises e conclusões acerca de exossomos pode, na realidade, ser uma combinação do efeito de exossomos e microvesículas.

Para excluir ou diminuir as contaminações do preparado de exossomos de outras vesículas, a etapa de caracterização é extremamente importante. Para tanto, são realizadas as análises de morfologia e tamanho combinadas com a detecção de marcadores exossomais específicos. A Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) preconiza que a caracterização dos exossomos atenda aos requisitos: i) detecção de proteínas transmembrana (tetraspaninas – CD9, CD63 ou CD81) e citosólica (Alix), ii) ausência ou baixos níveis de contaminação com *debris* celulares ou marcadores não exossomais (citocromo C) (Lötvall et al., 2014).

Outra desvantagem na utilização do método de centrifugação diferencial e ultracentrifugação é que a alta velocidade de centrifugação ($100.000 \times g$) induz o colapso e dano da membrana do exossomo ou mesmo a agregação destes. Como consequência, os danos na membrana podem levar à alterações na quantificação do conteúdo exossomal e a agregação pode levar a uma interpretação errônea em relação ao tamanho e concentração, quanto aos níveis proteicos e gênicos (Lee et al., 2016).

No desenvolvimento deste trabalho, foi realizada o isolamento de exossomos de sobrenadante de cultura de C8166 por ultracentrifugação utilizando o rotor *swing bucket*. Foi escolhido o rotor *swing bucket*, pois foi observado que pode ser utilizado um volume maior de

sobrenadante e que o rendimento, em relação a quantidade de exossomos recuperados era maior que quando utilizado o rotor de ângulo fixo (dados não mostrados).

Para garantir que o isolado de vesículas fosse composto majoritariamente de exossomos, foi realizada uma etapa de caracterização bem estabelecida. Diversas metodologias foram utilizadas para garantir o tamanho das vesículas, como o NTA e DLS. Além disso, pela microscopia eletrônica pôde-se observar tanto o tamanho e a morfologia quanto a presença de agregados de vesículas. Por fim, seguindo-se com a recomendação da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares, foram detectadas proteínas citosólicas (Alix) e transmembrana (CD63) e observou-se ausência de citocromo c nos isolados de exossomos, indicando se tratar deste tipo de vesículas sem contaminação por *debris* celulares ou outras vesículas não endossomais.

Ainda neste trabalho, foi detectado o RNAm viral *tax* no conteúdo dos exossomos isolados de células da linhagem celular C8166. Um estudo similar desenvolvido por Jaworski e cols. (2014) isolou exossomos de células da mesma linhagem e observou que seu conteúdo apresentava o RNAm viral *tax*, sua proteína traduzida Tax e as citocinas: proteína reguladora de crescimento (Gro) e Gro- α , fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e interleucina (IL)-6. Os autores também observaram que Tax era secretada via exossomos e não por meio de outros tipos de partículas celulares. (Jaworski et al., 2014).

Tomados em conjuntos os resultados de Jaworski e cols. (2014) com os resultados obtidos no decorrer do nosso estudo, é possível inferir que a molécula viral TAX, seja RNAm ou proteína, é capaz de induzir uma resposta inflamatória no organismo hospedeiro sem a participação direta da partícula viral.

Um trabalho mais recente, entretanto, demonstrou que vesículas extracelulares (VE) isoladas de plasma de indivíduos infectados pelo HTLV-1 não continham as proteínas virais, tanto em indivíduos assintomáticos quanto em pacientes com HAM/TSP (Jeannin et al.,

2018). Neste trabalho, não houve separação entre exossomos e microvesículas. Ainda, os autores demonstraram que as VE de indivíduos infectados eram menores quando comparados à indivíduos saudáveis (controle) e que as VE de indivíduos infectados pelo HTLV-1 que eram assintomáticos apresentavam-se em maior concentração no plasma do que as VE de pacientes HAM/TSP (Jeannin et al., 2018). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com um trabalho anterior do nosso grupo, no qual observou-se que exossomos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 não apresentavam a proteína viral Tax (Salustiano et al., 2016).

Após a detecção do RNAm viral *tax* nos exossomos, foi investigado se este poderia ser transferido dos exossomos para uma célula receptora. As PBMC de indivíduos saudáveis, e, portanto, sem expressão de genes virais, foram expostas aos exossomos de células infectadas pelo HTLV-1 da linhagem celular C8166 por 72 horas. Ao final deste período, foi extraído o RNA total das PBMC e confirmada a presença do RNAm viral *tax*. Este é o primeiro trabalho a detectar a presença de *tax* em células receptoras após a exposição a exossomos isolados de células infectadas pelo HTLV-1.

A molécula TAX é frequentemente descrita como um dos importantes fatores para o desenvolvimento de HAM/TSP. Tax é uma proteína transativadora e do HTLV-1 e induz a expressão de uma variedade de genes celulares pela ativação das vias de sinalização NF- κ B e CREB/ATF (Matsuoka & Jeang, 2011). Pela ativação destas vias, ocorre, além da modulação de outros processos, a inibição de pontos de verificação do ciclo celular e consequentemente sua aceleração e o aumento da expressão de vários genes celulares, como *CD25 (IL2RA)*, *IFNG*, *IL6*, *IL15*, *GM-CSF*, *TNFB* e *CCL22* (revisado por Bangham, 2017).

Além disso, Tax é relatada como o antígeno imunológico mais dominante do HTLV-1 e durante sua replicação promove a resposta imunológica do hospedeiro. Dessa forma, quando linfócitos infectados pelo HTLV-1 penetram no sistema nervoso central (SNC), a expressão de Tax no SNC pode induzir uma forte reação inflamatória e subsequentemente induzir o

desenvolvimento de HAM/TSP. A produção de IFN- γ por linfócitos infiltrados no SNC já foi reportado em pacientes com HAM/TSP (Umehara et al., 1994). Adicionalmente, altos níveis de IFN- γ no fluido cefalorraquidiano de pacientes com HAM/TSP também já foram descritos (Nagai et al., 2001). Além disso, Tax induz a liberação de TNF- α , IL-6 and IL-1 β por células da micróglia (Dhib-Jalbut et al., 1994) e TNF- α por células neuronais (Cowan & Alexander, 1997).

No presente trabalho foi questionado se os exossomos isolados de células infectadas pelo HTLV-1 da linhagem celular C8166, que continham *tax*, eram capazes de induzir a produção de citocinas inflamatórias por linfócitos T. Após o cultivo de PBMC de indivíduos saudáveis expostos a estes exossomos, foi avaliada a expressão das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-4, perforina e granzima B por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Foi observado um aumento significativo na expressão de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Não houve aumento na expressão de TNF- α pelos linfócitos T expostos aos exossomos, entretanto, observou-se uma tendência para o aumento, que poderia ter sido estabelecida se a amostragem fosse maior. Não houve diferença na expressão de IL-4, perforina e granzima B pelos linfócitos T expostos aos exossomos quando comparados aos não expostos.

Durante o curso da infecção pelo HTLV-1, linfócitos T CD4⁺ são infectadas preferencialmente pelo vírus que são ativadas e infiltram o sistema nervoso central. Neste processo, estas células produzem ou induzem a produção de citocinas inflamatórias, que possuem um papel importante na patogênese e nas manifestações clínicas da HAM/TSP (Gross et al., 2016; Ollière et al., 2011; Richardson et al., 1990). Os linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1 em pacientes HAM/TSP exibem proliferação espontânea além de aumentarem a produção de citocinas inflamatórias como citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-6 (Bangham & Osame, 2005; Jacobson et al., 1990; Montanheiro et al., 2009), enquanto que em indivíduos assintomáticos é observado uma alta frequência de IL-10 (Brito-Melo et al., 2001).

Os níveis de citocinas neurotóxicas, especialmente IFN- γ e TNF- α , já foram reportados como elevados no líquido cefalorraquidiano de pacientes com HAM/TSP (Nagai et al., 2009). Além disso, no sistema nervoso central, Tax induz a produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β pelas células da microglia (Dhib-Jalbut et al., 1994) e TNF- α pelas células neuronais (Cowan et al., 1997). Achados como estes demonstram que os pacientes com HAM/TSP apresentam uma resposta imunológica característica de perfil Th1 (IFN- γ , TNF- α) e diminuição de perfil Th2 (IL-4, IL-10), o que corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho.

No trabalho de Jaworski e cols (2014), os autores expuseram células dendríticas a exossomos isolados de células de linhagens infectadas pelo HTLV-1. Os autores observaram um aumento na expressão de IL-2, IL-5 and IL-6 após o período de exposição aos exossomos que continham Tax e também ao tratamento com a proteína solúvel Tax, indicando que esta molécula viral é importante na produção de citocinas.

Outros autores já demonstraram que a presença de moléculas virais nos exossomos pode levar a um aumento na expressão de citocinas. Em um estudo, os exossomos isolados de células de uma linhagem de hepatocarcinoma infectada pelo vírus da hepatite C (HCV) continham RNA viral e era capazes de ativar células dendríticas plasmocitóides a aumentarem a expressão de IFN- α (Dreux et al., 2012). Um outro estudo demonstrou que exossomos isolados de células infectadas pelo HIV-1 contém moléculas virais, como TAR RNA, e que esta molécula, nas células receptoras, aumenta a expressão *in vitro* de citocinas inflamatórias, como IL-6 e TNF- β , em macrófagos primários e células neuronais de camundongos (Sampey et al., 2016). Os autores sugerem que, apesar desse fenômeno ter sido observado *in vitro*, o mesmo pode ocorrer *in vivo*, onde os exossomos poderiam atravessar a barreira hematoencefálica e estimular células do sistema nervoso central a produzir citocinas inflamatórias. O mesmo poderia ocorrer na infecção pelo HTLV-1.

As moléculas *tax* RNAm e Tax proteína já foram descritas como circulantes no plasma de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e, desta forma, poderiam exercer um efeito das células imunológicas e do SNC, levando a um quadro inflamatório observado nos pacientes HAM/TSP. A incorporação destas moléculas dentro de exossomos, envoltas por uma bicamada lipídica, poderia protegê-las da degradação por RNAses e proteases. Ainda, devido ao pequeno tamanho dos exossomos e sua facilidade de atravessar barreiras, como a barreira hematoencefálica, estes exossomos, e por consequente as moléculas virais, poderiam alcançar mais facilmente o SNC e induzir ao processo neurodegenerativo. Assim, torna-se possível um novo ramo de interpretação da patogênese da HAM/TSP, no qual exossomos contendo *tax* RNAm alcançaria o SNC e induziria a uma resposta inflamatória pelas células residentes.

Os estudos acerca da participação dos exossomos na infecção pelo HTLV-1 são escassos e relativamente novos. São necessários maiores esforços para que relações de causa e efeito possam ser estabelecidas. Dessa forma, é imprescindível que estudos nessa área relacionem os achados *in vitro* com os *in vivo*. Um estudo do nosso grupo avaliou indivíduos infectados pelo HTLV-1, tanto assintomáticos como sintomáticos com HAM/TSP. Nesse estudo, observou-se que os exossomos destes dois grupos apresentam características distintas e, desta forma, podem estar relacionados aos mecanismos de desenvolvimento de HAM/TSP (Salustiano et al., 2016). Como citado anteriormente, foi possível verificar que os achados do presente trabalho se correlacionam com os achados de Salustiano e cols (2016) na detecção do RNAm viral *tax* nos exossomos. Ainda, o aumento de citocinas inflamatórias por linfócitos T após exposição aos exossomos é condizente aos achados encontrados na literatura e condizente com a patogênese da HAM/TSP.

Em conclusão, foi demonstrado que células infectadas pelo HTLV-1 produzem exossomos contendo o RNAm viral *tax* e que este é transferido para linfócitos T levando a um aumento de citocinas inflamatórias. Este achado poderá contribuir para a elucidação dos

mecanismos de patogênese da infecção pelo HTLV-1 e da HAM/TSP. Outros experimentos são necessários para confirmar o efeito imunoestimulatório dos exossomos isolados de células infectadas pelo HTLV-1 e seu papel *in vivo* durante esta infecção viral.

Conclusão

VI. CONCLUSÃO

Neste trabalho, os exossomos provenientes das células infectadas pelo HTLV-1 foram isolados e caracterizados quanto à morfologia, tamanho e presença de marcadores proteicos. Foi detectado o RNAm viral do gene *tax* nestes exossomos e que o mesmo é transferido para linfócitos T. Este processo é capaz de induzir a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Os achados deste trabalho podem colaborar para a elucidação dos mecanismos de indução da resposta inflamatória observada na HAM/TSP.

Referências Bibliográficas

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA, J.; LEPOUTRE, V.; WIGDAHL, B.; KHAN, Z.K.; JAIN, P. Induction of pro-inflammatory cytokines by human T-cell leukemia virus type-1 Tax protein as determined by multiplexed cytokine protein array analyses of human dendritic cells. **Biomed. Pharmacother** 61, 201–208, 2007.
- ALI SA, HUANG MB, CAMPBELL PE, ROTH WW, CAMPBELL T, KHA M, NEWMAN G, VILLINGER F, POWELL MD, BOND VC. Genetic characterization of HIV type 1 Nef-induced vesicle secretion. **AIDS Res Huma Retroviruses** 26(2); 173-92, 2010.
- ANDERSON, M., KASHANCHI, F., JACOBSON, S. Role of exosomes in human retroviral mediated disorders. **J Neuroimmune**, Epub ahead of print, 2018.
- BANG C, THUM T. Exosomes: new players in cell-cell communication. **Int J Biochem Cell Biol** 44(11);2060-4, 2012.
- BANGHAM, C.R.M. Human T Cell Leukemia Virus Type 1: Persistence and Pathogenesis. **Annual Rev of Immunol** 36, 43-71, 2017.
- BIDDISON, W.E., KUBOTA, R., KAWANISHI, T., TAUB, D.D., CRUIKSHANK, W.W., CENTER, D.M., CONNOR, E.W., UTZ, U., AND JACOBSON, S. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-specific CD8⁺ CTL clones from patients with HTLV-I-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. **J Immunol** 159, 2018-2025, 1997.
- BISWAS, H.H., ENGSTROM, J.W., KAIDAROVA, Z., GARRATTY, G., GIBBLE, J.W., NEWMAN, B.H., SMITH, J.W., ZIMAN, A., FRIDEY, J.L., SACHER, R.A. Neurologic abnormalities in HTLV-I- and HTLV-II-infected individuals without overt myelopathy. **Neurology** 73, 781-789, 2009.
- BLATTNER, W.A., KALYANARAMAN, V.S., ROBERT-GUROFF, M., LISTER, T.A., GALTON, D.A., SARIN, P.S., CRAWFORD, M.H., CATOVSKY, D., GREAVES, M., AND GALLO, R.C. The human type-C retrovirus, HTLV, in Blacks from the Caribbean region, and relationship to adult T-cell leukemia/lymphoma. **Int J Cancer** 30, 257-264, 1982.
- BRITO-MELO GE, PERUHYPE-MAGALHAES V, TEIXEIRA-CARVALHO A, et al. Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. **J Acquir Immune Defic Syndr** 27:1–6, 2001.
- CALATTINI, S., BETSEM, E., BASSOT, S., CHEVALIER, S.A., MAHIEUX, R., FROMENT, A., AND GESSAIN, A. New strain of human T lymphotropic virus (HTLV) type 3 in a Pygmy from Cameroon with peculiar HTLV serologic results. **J Infect Dis** 199, 561-564, 2009.
- CALATTINI, S., CHEVALIER, S.A., DUPREZ, R., BASSOT, S., FROMENT, A., MAHIEUX, R., AND GESSAIN, A. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology** 2, 30, 2005.
- CAMPBELL PE, ISAYEV O, ALI SA, ROTH WW, HUANG MB, POWELL MD, LESZCZYNSKI J, BOND VC. Validation of anovel secretion modification region (SMR) of HIV-1 Nef using cohort sequence analysis and molecular modeling. **J Mol Model** 18(10); 4603-13, 2012.
- CARNEIRO-PROIETTI, A.B., RIBAS, J.G., CATALAN-SOARES, B.C., MARTINS, M.L., BRITO-MELO, G.E., MARTINS-FILHO, O.A., PINHEIRO, S.R., ARAUJO ADE, Q., GALVAO-CASTRO, B., DE OLIVEIRA, M.S. [Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop** 35, 499-508, 2002.
- CATALAN-SOARES, B.C., CARNEIRO-PROIETTI, A.B., DA FONSECA, F.G., CORREA-OLIVEIRA, R., PERALVA-LIMA, D., PORTELA, R., RIBAS, J.G., GONCALVES, D.U., AND

- PROIETTI, F.A. HLA class I alleles in HTLV-1-associated myelopathy and asymptomatic carriers from the Brazilian cohort GIPH. **Med Microbiol Immunol** 198, 1-3, 2009.
- CAVROIS, M., WAIN-HOBSON, S., GESSAIN, A., PLUMELLE, Y., AND WATTEL, E. Adult T-cell leukemia/lymphoma on a background of clonally expanding human T-cell leukemia virus type-1-positive cells. **Blood** 88, 4646-4650, 1996.
- COOPER SA, VAN DER LOEFF MS, TAYLOR G. The neurology of HTLV-1 infection. *Pract Neurol* 9:16–26, 2009.
- COWAN E, ALEXANDER R. Induction of tumor necrosis factor alpha in human neuronal cells by extracellular human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax. *J Virol* 1997; 71(9):6982–9.
- DHIB-JALBUT S, HOFFMAN PM, YAMABE T, SUN D, XIA J, EISENBERG H, et al. Extracellular human T-cell lymphotropic virus type I Tax protein induces cytokine production in adult human microglial cells. *Ann Neurol*; 36(5):787–90, 1994.
- DOONEIEF, G., MARLINK, R., BELL, K., MARDER, K., RENJIFO, B., STERN, Y., AND MAYEUX, R. Neurologic consequences of HTLV-II infection in injection-drug users. **Neurology** 46, 1556-1560, 1996.
- DREUX, M., GARAIGOSRTA, U., BOYD, B., DECEMBRE, E., CHUNG, J., WHITTEN-BAUER, C., WIELAND, S., CHISARI, F.V. Short-range exosomal transfer of viral RNA from infected cells to plasmacytoid dendritic cells triggers innate immunity. **Cell Host Microbe** 12(4), 558-570, 2012.
- ETOH, K., TAMIYA, S., YAMAGUCHI, K., OKAYAMA, A., TSUBOUCHI, H., IDETA, T., MUELLER, N., TAKATSUKI, K., AND MATSUOKA, M. Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells in vivo. **Cancer Res** 57, 4862-4867, 1997.
- FACKLER OT, PETERLIN BM. Endocytic entry of HIV-1. **Curr Biol** 10; 1005-08, 2000.
- FAURÉ J, LACHENAL G, COURT M, HIRRLINGER J, CHATELLARD-CAUSSE C, BLOT B, GRANGE J, SCHOEHN G, GOLDBERG Y, BOYER V. Exosomes are released by cultured cortical neurons. **Mol Cell Neurosci** 31; 642-648, 2006.
- FERREIRA JUNIOR, O.C., VAZ, R.S., CARVALHO, M.B., GUERRA, C., FABRON, A.L., ROSEMBLIT, J., AND HAMERSCHLAK, N. Human T-lymphotropic virus type I and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from Sao Paulo, Brazil. **Transfusion** 35, 258-263, 1995.
- FEUER, G., AND GREEN, P.L. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. **Oncogene** 24, 5996-6004, 2005.
- FLEMMING A, SAMPEY G, CHUNG MC, BAILEY C, VAN HOEK ML, KASHANCHI F, HAKAMI RM. The carrying pigeons of the cell: Exosomes and their role in infectious diseases caused by human pathogens. **Pathog Dis**. 2014.
- GALVAO-CASTRO, B., LOURES, L., RODRIQUES, L.G., SERENO, A., FERREIRA JUNIOR, O.C., FRANCO, L.G., MULLER, M., SAMPAIO, D.A., SANTANA, A., PASSOS, L.M. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion** 37, 242-243, 1997.
- GASSER O, SCHIFFERLI JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate antiinflammatory microparticles by ectocytosis. **Blood** 104: 2543-2548, 2004.
- GESSAIN, A., AND CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Front Microbiol** 3, 388, 2012.

- GESSAIN, A., BARIN, F., VERNANT, J., GOUT, O., MAURS, L., CALENDER, A. DE THE, G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tiopical spastic paraparesis. **Lancet** 2, 407-401, 1985.
- GESSAIN, A., GALLO, R.C., AND FRANCHINI, G. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. **J Virol** 66, 2288-2295, 1992.
- GESSAIN, A., MAHIEUX, R., AND DE THE, G. Genetic variability and molecular epidemiology of human and simian T cell leukemia/lymphoma virus type I. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol** 13 Suppl 1, S132-145, 1996.
- GOTUZZO, E., ARANGO, C., DE QUEIROZ-CAMPOS, A., AND ISTURIZ, R.E. Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. **Infect Dis Clin North Am** 14, 211-239, x-xi, 2000.
- GROSS C, THOMA-KRESS AK. Molecular mechanisms of HTLV-1 cell-to-cell transmission. **Viruses**. 8(3):1–22, 2016.
- HADDAD, R. ; Cilião Alves, D.C. ; SILVA, M. C. R. ; AZEVEDO, R. ; Pombo-Oliveira, M.S. ; TAKAYANAGUI, O. M. ; DONADI, E. A. ; COVAS, D. T. ; KASHIMA, S. . HLA-G 14-bp Insertion/Deletion Polymorphism Is a Risk Factor for HTLV-1 Infection.. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 02, p. 01, 2010.
- HADDAD, R. ; KASHIMA, S. ; Rodrigues, E.V. ; PALMA, P. B. V. ; ZAGO, M. A. ; COVAS, D. T. . Inhibition of Expression of HTLV-1 Structural Genes Mediated by Short Hairpin RNA In Vitro. **Anticancer Research**, v. 31, p. 2173-2178, 2011., v. 173, p. 92-98, 2011.
- HADDAD, R., CILIAO ALVES, D.C., ROCHA-JUNIOR, M.C., AZEVEDO, R., DO SOCORRO POMBO-DE-OLIVEIRA, M., TAKAYANAGUI, O.M., DONADI, E.A., COVAS, D.T., AND KASHIMA, S. HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism is a risk factor for HTLV-1 infection. **AIDS Res Hum Retroviruses** 27, 283-288, 2011.
- HADDAD, RODRIGO ; KASHIMA, SIMONE ; RODRIGUES, EVANDRA STRAZZA; AZEVEDO, ROCHELE; PALMA, PATRÍCIA VIANNA BONINI ; DE MAGALHÃES, DANIELLE APARECIDA ROSA ; ZAGO, MARCO ANTONIO ; COVAS, DIMAS TADEU . Silencing of HTLV-1 gag and env genes by small interfering RNAs in HEK 293 cells.
- HINO, S. Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci** 87, 152-166, 2011.
- HJELLE, B., APPENZELLER, O., MILLS, R., ALEXANDER, S., TORREZ-MARTINEZ, N., JAHNKE, R., AND ROSS, G. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. **Lancet** 339, 645-646, 1992.
- JAIN, P., MANUEL, S.L., KHAN, Z.K., AHUJA, J., QUANN, K., AND WIGDAHL, B. DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. **J Virol** 83, 10908-10921, 2009.
- JANOWSKA-WIECZOREK A, MAJKA M, KIJOWSKI J, BAJ-KRZYWORZEKA M, RECA R, TURNER AR, RATAJCZAK J, EMERSON SG, KOWALSKA MA, RATAJCZAK MZ. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. **Blood** 98: 3143-9314, 2001.
- JANOWSKA-WIECZOREK A, WYSOCZYNSKI M, KIJOWSKI J, MARQUEZ-CURTIS L, MACHALINSKI B, RATAJCZAK J, RATAJCZAD MZ. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. **Int J Cancer** 113; 752-760, 2005.
- JAWORSKI, E. et al. Humant T-lymphotropic virus type 1-infected cells secrete exosomes that contain Tax protein. **J Biol Chem** 289(32), 22284-22305, 2014.

- JEANNIN, P., CHAZE, T., GIANETTO, Q.G., MATONDO, M., GOUT, O., GESSAIN, A., AFONSO, P.V. Proteomic analysis of plasma extracellular vesicles reveals mitochondrial stress upon HTLV-1 infection. **Sci Rep Nat** 8:5170, 1-7, 2018.
- JONES, K.S., PETROW-SADOWSKI, C., HUANG, Y.K., BERTOLETTE, D.C., AND RUSCETTI, F.W. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. **Nat Med** 14, 429-436, 2008.
- KALYANARAMAN, V.S., SARNGADHARAN, M.G., ROBERT-GUROFF, M., MIYOSHI, I., GOLDE, D., AND 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** 218, 571-573, 1982.
- KAPLAN, J.E., KHABBAZ, R.F., MURPHY, E.L., HERMANSEN, S., ROBERTS, C., LAL, R., HENEINE, W., WRIGHT, D., MATIJAS, L., THOMSON, R., et al. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. The Retrovirus Epidemiology Donor Study Group. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol** 12, 193-201, 1996.
- KAPLAN, J.E., OSAME, M., KUBOTA, H., IGATA, A., NISHITANI, H., MAEDA, Y., KHABBAZ, R.F., AND JANSSEN, R.S. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. **J Acquir Immune Defic Syndr** 3, 1096-1101, 1990.
- KARLSSON M. ‘Tolerosomes’ are produced by intestinal epithelial cells. **Eur J Immunol** 31; 2892-2900, 2001.
- KERYER-BIBENS C, PIOCHE-DURIEU C, VILLEMANT C, SOUQUÈRE S, NISHI N, HIRASHIMA M, MIDDELDORP J & BUSSON P. Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. **BMC Cancer** 6: 283, 2006.
- KONOSHENKO, M.Y., CEKCHNOV, E.A., VLASSOV, A.V. LAKTIONOV, P.P. Isolation of extracellular vesicles: General methodology and latest trends. **Biomed Res Int** 8545347, 2018.
- KURODA, Y., AND MATSUI, M. Cerebrospinal fluid interferon-gamma is increased in HTLV-I-associated myelopathy. **J Neuroimmunol** 42, 223-226, 1993.
- KUSUHARA, K., SONODA, S., TAKAHASHI, K., TOKUGAWA, K., FUKUSHIGE, J., AND UEDA, K. Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I): a fifteen-year follow-up study in Okinawa, Japan. **Int J Cancer** 40, 755-757, 1987.
- LACHENAL G, PERNET-GALLAY K, CHIVET M, HEMMING FJ, BELLY A, BODON G, BLOT B, HAASE G, GOLDBERG Y, SADOUL R. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. **Mol Cell Neurosci** 46; 409-18, 2011.
- LAGRENADE, L., HANCHARD, B., FLETCHER, V., CRANSTON, B., AND BLATTNER, W. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **Lancet** 336, 1345-1347, 1990.
- LAIRMORE, M.D., HAINES, R., AND ANUPAM, R. Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. **Curr Opin Virol** 2, 474-481, 2012.
- LAIRMORE, M.D., JASON, J.M., HARTLEY, T.M., KHABBAZ, R.F., DE, B., AND EVATT, B.L. Absence of human T-cell lymphotropic virus type I coinfection in human immunodeficiency virus-infected hemophilic men. **Blood** 74, 2596-2599, 1989.
- LECLERCQ, I., CAVROIS, M., MORTREUX, F., HERMINE, O., GESSAIN, A., MORSCHHAUSER, F., AND WATTEL, E. Oligoclonal proliferation of human T-cell leukaemia

virus type 1 bearing T cells in adult T-cell leukaemia/lymphoma without deletion of the 3' provirus integration sites. **Br J Haematol** 101, 500-506, 1998.

LEE Y, ANDALOUSSI SEL, WOOD MJA. Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. **Human Molecular Genetics** 21(1); R125-34, 2012.

LEE, M.-J., PARK, D.-H., & KANG, J.-H. Exosomes as the source of biomarkers of metabolic diseases. **Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, 21(3), 119–125., 2016.

LENASSI M, CAGNEY G, LIAO M, VAUPOTIC T, BARTHOLOMEEUSEN K, CHENG Y, KROGAN NJ, PLEMENITAS A, PETERLIN BM. HIV Nef is secreted in exosomes and triggers apoptosis in bystander CD4⁺ T cells. **Traffic** 11:110–122, 2010.

LEPOUTRE, V., JAIN, P., QUANN, K., WIGDAHL, B., AND KHAN, Z.K. Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. **Front Biosci** 14, 1152-1168, 2009.

LIVSHITS MA, KHOMYAKOVA E, EVTUSHENKO EG, LAZAREV VN, KULEMIN NA, SEMINA SE, et al. Corrigendum: Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. **Sci Rep** 6:21447, 2016.

LONGATTI, A., BOYD, B., CHISARI, F.V. Virion-independent transfer of replication-competent hepatitis C virus RNA between permissive cells. **J Virol** 89(5), 2956-2961, 2015.

LÖTVALL, J., HILL, A. F., HOCHBERG, F., BUZÁS, E. I., DI VIZIO, D., GARDINER, C., ... THÉRY, C. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, 3, 10.3402/jev.v3.26913, 2014.

LUNARDI-ISKANDAR Y, GESSAIN A, LAM VH, GALLO RC. Abnormal in vitro proliferation and differentiation of T cell colony-forming cells in patients with tropical spastic paraparesis/human T lymphocyte virus type I (HTLV-I)-associated myeloencephalopathy and healthy HTLV-I carriers. **J Exp Med** 177:741–50, 1993.

MACK M, KLEINSCHMIDT A, BRUHL H, KLIER C, NELSON PJ, CIHAK J, PLACHÝ J, STANGASSINGER M, ERFLE V, SCHLONDORFF D. Transfer of the chemokine receptor CCR 5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. **Nat Med** 6:769-75, 2000.

MAEDA, Y., FURUKAWA, M., TAKEHARA, Y., YOSHIMURA, K., MIYAMOTO, K., MATSUURA, T., MORISHIMA, Y., TAJIMA, K., OKOCHI, K., AND HINUMA, Y. Prevalence of possible adult T-cell leukemia virus-carriers among volunteer blood donors in Japan: a nation-wide study. **Int J Cancer** 33, 717-720, 1984.

MALTA, TATHIANE MAISTRO ; SILVA, ISRAEL TOJAL ; PINHEIRO, DANIEL GUARIZ ; DOS SANTOS, ANEMARIE RAMOS ; PINTO, MARIANA TOMAZINI ; PANEPUCCI, RODRIGO ALEXANDRE ; TAKAYANAGUI, OSVALDO MASSAITI ; TANAKA, YUETSU ; COVAS, DIMAS TADEU ; KASHIMA, SIMONE . Altered expression of degranulation-related genes in CD8⁺ T cells in HTLV-1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. xx, p. 130110034702004, 2013.

MATHIVANAN S, FAHNER CJ, REID GE, SIMPSON RJ. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. **Nucleic Acids Res** 40; D1241-44, 2012.

MATSUOKA, M., JEANG, K.-T. Human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ, and therapy. **Oncogene**, 30(12), 1379–1389, 2011.

MAYERS JR AND AUDHYA A. Vesicle formation within endosomes: and ESCRT marks the spots. **Commun Integr Biol** 5; 50-56, 2012.

- MECKES DG JR, GUNAWARDENA HP, DEKROON RM, HEATON PR, EDWARDS RH, OZGUR S, GRIFFITH JD, DAMANIA B, RAAB-TRAUB N. Modulation of B-cell exosome proteins by gamma herpesvirus infection. **PNAS** 110(31); E2925-33, 2013.
- MIYAMOTO, K., TOMITA, N., ISHII, A., NISHIZAKI, T., KITAJIMA, K., TANAKA, T., NAKAMURA, T., WATANABE, S., AND ODA, T. Transformation of ATLA-negative leukocytes by blood components from anti-ATLA-positive donors in vitro. **Int J Cancer** 33, 721-725, 1984.
- MOCHIZUKI, M., ONO, A., IKEDA, E., HIKITA, N., WATANABE, T., YAMAGUCHI, K., SAGAWA, K., AND ITO, K. HTLV-I uveitis. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol** 13 Suppl 1, S50-56, 1996.
- MONTANHEIRO, P.A., PENALVA DE OLIVEIRA, A.C., SMID, J., FUKUMORI, L.M., OLAH, I., DA S DUARTE, A.J., CASSEB, J. The elevated interferon gamma production is an importante immunological marker in HAM/TSP pathogenesis. **Scand J Immunol** 70, 403-7, 2009.
- MORGAN, O. HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: How far have we come? **West Indian Med. J** 60, 505–512, 2011.
- MURPHY, E.L., FIGUEROA, J.P., GIBBS, W.N., BRATHWAITE, A., HOLDING-COBHAM, M., WATERS, D., CRANSTON, B., HANCHARD, B., AND BLATTNER, W.A. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Ann Intern Med** 111, 555-560, 1989a.
- MURPHY, E.L., WATANABE, K., NASS, C.C., OWNBY, H., WILLIAMS, A., AND NEMO, G. Evidence among blood donors for a 30-year-old epidemic of human T lymphotropic virus type II infection in the United States. **J Infect Dis** 180, 1777-1783, 1999.
- NAGAI M, YAMANO Y, BRENNAN MB, MORA CA, JACOBSON S. Increased HTLV-I proviral load and preferential expansion of HTLV-I tax-specific CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from patients with HAM/TSP. **Ann Neurol**; 50(6):807–12, 2001.
- NARAYANAN A, IORDANSKIY S, DAS R, VAN DUYNE R, SANTOS S, JAWORSKI E, GUENDEL I, SAMPEY G, DALBY E, IGLESIAS-USSEL M, PPRATILOFF A, HAKAMI R, KEHN-HALL K, YOUNG M, SUBRA C, GILBERT C, BAILEY C, ROMERIO F, KASHANCHI F. Exosomes derived from HIV-1-infected cells contain trans-activation response element RNA. **J Biol Chem** 288: 20014–20033, 2013.
- NISHIOKA, K., MARUYAMA, I., SATO, K., KITAJIMA, I., NAKAJIMA, Y., AND OSAME, M. Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. **Lancet** 1, 441, 1989.
- OHBO, K., SUGAMURA, K., SEKIZAWA, T., AND KOGURE, K. Interleukin-6 in cerebrospinal fluid of HTLV-I-associated myelopathy. **Neurology** 41, 594-595, 1991.
- OKOCHI, K., SATO, H., AND HINUMA, Y. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. **Vox Sang** 46, 245-253, 1984.
- OLIÈRE S, DOUVILLE R, SZE A, BELGNAOUI SM, HISCOTT J. Modulation of innate immune responses during human T-cell leukemia virus (HTLV-1) pathogenesis. **Cytokine Growth Factor Rev.** 22(4):197–210, 2011.
- OTAGUIRI, K.K. Avaliação do efeito funcional de microRNAs na infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1). 2013. 123fl. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. 2013.
- PEGTEL DM, COSMOPOULOS K, THORLEY-LAWSON DA, VAN EIJNDHOVEN MA, HOPMANS ES, LINDENBERG JL, DE GRUIJL TD, WURDINGER T, MIDDELDORP JM. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. **PNAS** 107(14); 6328-33, 2010.
- PINTO, M.T., RODRIGUES, E.S., MALTA, T.M., AZEVEDO, R., TAKAYANAGUI, O.M., VALENTE, V.B., UBIALI, E.M., COVAS, D.T., AND 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** 54, 123-129, 2012.

PINTO, MARIANA TOMAZINI ; MALTA, TATHIANE MAISTRO ; RODRIGUES, EVANDRA STRAZZA ; PINHEIRO, DANIEL GUARIZ ; PANEPUCCI, RODRIGO ALEXANDRE ; FARIAS, KELEN CRISTINA RIBEIRO MALMEGRIM DE ; DE PAULA ALVES SOUSA, ALESSANDRA ; TAKAYANAGUI, OSVALDO MASSAITI ; TANAKA, YUETSU ; COVAS, DIMAS TADEU ; KASHIMA, SIMONE . Genes related to antiviral activity, cell migration, and lysis are differentially expressed in CD4+ T cells in HAM/TSP patients.. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 1, p. 130917035218000, 2013.

PIQUE, C., AND JONES, K.S. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. **Front Microbiol** 3, 378, 2012.

POIESZ, B.J., RUSCETTI, F.W., GAZDAR, A.F., BUNN, P.A., MINNA, J.D., AND 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** 77, 7415-7419, 1980.

POPOVIC, M., SARIN, P.S., ROBERT-GURROFF, M., KALYANARAMAN, V.S., MANN, D., MINOWADA, J., AND GALLO, R.C. Isolation and transmission of human retrovirus (human t-cell leukemia virus). **Science** 219, 856-859, 1983.

RAJENDRAN L, HONSHO M, ZAHN TR, KELLER P, GEIGER KD, VERKADE P, SIMONS K. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are release in association with exosomes. **Proc Natl Acad Sci USA** 103; 11172-77, 2006.

RAMAKRISHNAIAH, V., THUMANN, C., FOFANA, I., HABERSETZER, F., PAN, Q., de RUITER, PE., WILLEMSSEN, R., DEMMERS, J.A., STALIN RAJ, V., JENSTER, G., KWEKKEBOOM, J., TILANUS, H.W., HAAGMANS, B.L., BAUMERT, T.F., VAN DER LANN, L.J. Exosome-mediated transmission of hepatitis C between human hepatoma Huh7.5 cells. **PNAS** 110(23), 13109-13, 2013.

RAPOSO, G., STOVOORGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles and friends. **J Cell Biol** 200(4), 373-383, 2013.

RECORD M, SUBRA C, SILVENTE-POIRO S, POIROT M. Exosomes as intercelular signalosomes and pharmacological effectors. **Biochem Pharmacol** 81; 1171-82, 2011.

RICHARDSON JH, EDWARDS AJ, CRUICKSHANK JK, RUDGE P, DALGLEISH AG. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. **J Virol**; 64(11):5682-7, 1990.

ROCHA-JUNIOR, M.C., HADDAD, R., CILIAO ALVES, D.C., DE DEUS WAGATSUMA, V.M., MENDES-JUNIOR, C.T., DEGHAIDE, N.H., TAKAYANAGUI, O.M., COVAS, D.T., DONADI, E.A., AND KASHIMA, S. Interleukin-18 and interferon-gamma polymorphisms are implicated on proviral load and susceptibility to human T-lymphotropic virus type 1 infection. **Tissue Antigens** 80, 143-150, 2012.

SABOURI, A.H., SAITO, M., USUKU, K., BAJESTAN, S.N., MAHMOUDI, M., FORUGHIPOUR, M., SABOURI, Z., ABBASPOUR, Z., GOHARJOO, M.E., KHAYAMI, E., et al. Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. **J Gen Virol** 86, 773-781, 2005.

SALUSTIANO, S.G. Análise da expressão de genes virais em exossomos provenientes do soro de indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1). 2016. 109 fl. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. 2016.

SAMAN S, KIM W, RAYA M, VISNICK Y, MIRO S, SAMAN S, JACKSON B, MCKEE AC, ALVAREZ VE, LEE NCY et al. Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is

selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. **J Biol Chem** 287; 3842-49, 2012.

SAMPEY, G.C., SAIFUDDIN, M., SCHWAB, A., BARCLAY, R., PUNYA, S., CHUNG, M.C., HAKAMI, R.M., ZADEH, MA., LEPENE, B., KLASE, Z.A., EL-HAGE, N., YOUNG, M., IORDANSKJY, S. KASHANCHI, F. Exosomes from HIV-1-infected cells stimulate production of pro-inflammatory cytokines through trans-activating response (TAR) RNA. **J Bio Chem** 291, 1251-66, 2016.

SAXINGER, W., BLATTNER, W.A., LEVINE, P.H., CLARK, J., BIGGAR, R., HOH, M., MOGHISSI, J., JACOBS, P., WILSON, L., JACOBSON, R. Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) antibodies in Africa. **Science** 225, 1473-1476, 1984.

SHARPLES RA, VELLA LJ, NISBET RM, NAYLOR R, PEREZ K, BARNHAM KJ, MASTERS CL, HILL AF et al. Inhibition of gamma-secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes. **FASEB J** 22; 1469-78, 2008.

SHIMOYAMA, M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). **Br J Haematol** 79, 428-437, 1991.

SIBON D, GABET AS, ZANDECKI M, et al. HTLV-1 propels untransformed CD4 lymphocytes into the cell cycle while protecting CD8 cells from death. **J Clin Invest** 116:974-83, 2006.

SIMPSON RJ, JENSEN SS, LIM JW. Proteomic profiling of exosomes: current perspectives. **Proteomics** 8(19); 4083-99, 2008.

SKOG J, WURDINGER T, VAN RIJIN S, MEIJER DH, GAINCHE L, SENA-ESTEVEZ M, CURRY WT JR, CARTER BS, KRICHEVSKY AM, BREAKFIELD XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nat Cell Biol** 10:1470-1476, 2008.

SKOKOS D, BOTROS HG, DEMEURE C, MORIN J, PERONET R, BIRKENMEIER G, BOUDALY S, MÉCHERI S. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. **K Immunol** 170; 3037-3045, 2003.

SKOKOS D. Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes. **J Immunol** 166; 868-76, 2001.

SODROSKI, J. The human T-cell leukemia virus (HTLV) transactivator (Tax) protein. **Biochim Biophys Acta** 1114, 19-29, 1992.

SONODA, S., LI, H.C., AND TAJIMA, K. Ethnoepidemiology of HTLV-1 related diseases: ethnic determinants of HTLV-1 susceptibility and its worldwide dispersal. **Cancer Sci** 102, 295-301, 2011.

SPRENT J. Direct stimulation of naive T cells by antigen-presenting cell vesicles. **Blood Cells Mol Dis** 35; 17-20, 2005.

STOLZING A AND GRUNE T. Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells. **FASEB J** 18; 743-45, 2004.

SUBRA C, GRAND D, LAULAGNIER K, STELLA A, MAMBEAU G, PAILLASSE M, DE MEDINA P, ONSARRAT B, PERRET B, SILVENTE-POIROT S, POIROT M, RECORD M. Exosomes account for vesicle-mediate transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. **J Lipid Res** 51; 2105-20, 2010.

TALLEDO, M., LOPEZ, G., HUYGHE, J.R., VERDONCK, K., ADAUI, V., GONZALEZ, E., BEST, I., CLARK, D., VANHAM, G., GOTUZZO, E., et al. Evaluation of host genetic and viral factors as surrogate markers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peruvian HTLV-1-infected patients. **J Med Virol** 82, 460-466, 2010.

- THERY C, OSTROWSKI M, SEGURA E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nat Rev Immunol** 9; 581-93, 2009.
- THERY C, ZITVOGEL L, AMIGORENA S. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nat Rev Immunol** 2; 569-79, 2002.
- TRINDADE, BRUNO CAETANO; SORGI, CARLOS ARTÉRIO; NICOLETE, LARISSA DEADAME DE FIGUEIREDO; Malta, Tathiane Maistro; Pinto, Mariana Tomazini ; Takayanagui, Osvaldo Massaiti; Covas, Dimas Tadeu ; FILHO, OLINDO ASSIS MARTINS ; Kashima, Simone ; FACCIOLI, LÚCIA HELENA . Leukotrienes Are Upregulated and Associated with Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)-Associated Neuroinflammatory Disease. **Plos One**, v. 7, p. e51873, 2012.
- UMEHARA F, IZUMO S, RONQUILLO AT, MATSUMURO K, SATO E, OSAME M. Cytokine expression in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. **J Neuropathol Exp Neurol**; 53(1):72–7, 1994.
- VALERI, V.W., HRYNIEWICZ, A., ANDRESEN, V., JONES, K., FENIZIA, C., BIALUK, I., CHUNG, H.K., FUKUMOTO, R., PARKS, R.W., FERRARI, M.G., et al. Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. **Blood** 116, 3809-3817, 2010.
- VINGTDEUX V, HAMDANE M, LOYENS A, GELÉ P, DROBECK H, BÉCARD S, GALAS M-C, DELACOURTE A, BEAUVILLAIN J-C, BUÉE L. Alkalizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. **J Biol Chem** 282. 18197-205, 2007.
- WATTEL, E., VARTANIAN, J.P., PANNETIER, C., AND WAIN-HOBSON, S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. **J Virol** 69, 2863-2868, 1995.
- WILLEMS, L., HASEGAWA, H., ACCOLLA, R., BANGHAM, C., BAZARBACHI, U., CARNEIRO-PROIETTI, A.B., CHENG, H., CHIECO-BIACHI, L., CIMINALE, V., COELHO-DOS-REIS, J., GALLO, R.C., GESSAIN, A., GOTUZZO, E. et al. Reducing the global burden of HTLV-I infection: An agenda for research and action. **Antiviral Res** 137, 41-48, 2017.
- 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. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc Natl Acad Sci U S A** 102, 7994-7999, 2005.
- YAMAGUCHI, K., AND WATANABE, T. Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. **Int J Hematol** 76 Suppl 2, 240-245, 2002.
- YAMAMOTO, N., OKADA, M., KOYANAGI, Y., KANNAGI, M., AND HINUMA, Y. Transformation of human leukocytes by cocultivation with an adult T cell leukemia virus producer cell line. **Science** 217, 737-739, 1982.
- Yamano, Y.; Araya, N.; Sato, T.; Utsunomiya, A.; Azakami, K.; Hasegawa, D.; Izumi, T.; Fujita, H.; Aratani, S.; Yagishita, N.; et al. Abnormally high levels of virus-infected INF- γ +CCR4+CD4+CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. **PLoS ONE** 2009, 4. [CrossRef] [PubMed]
- YANG M, CHEN J, SU F, YU B, LIN L, LIU Y, HUANG J-D, SONG E. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. **Mol Cancer** 10; 117, 2011.
- YOSHIDA, M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. **Annu Rev Immunol** 19, 475-496, 2001.

ZHENG, H., WOLFE, N.D., SINTASATH, D.M., TAMOUFE, U., LEBRETON, M., DJOKO, C.F., DIFFO JLE, D., PIKE, B.L., HENEINE, W., AND SWITZER, W.M. Emergence of a novel and highly divergent HTLV-3 in a primate hunter in Cameroon. **Virology** 401, 137-145, 2010.

VIII. ANEXOS

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

Ribeirão Preto, 13 de maio de 2015.

Ofício nº 1741/2015
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 3437/2015

Prezadas Pesquisadoras,

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

Atenciosamente.

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

Ilustríssimas Senhoras

PROFª DRª SIMONE KASHIMA HADDAD

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

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

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FMA-00002733; IRB-00002185 e
Registro Plataforma Brasil ICONEP nº 5443
(015) 3602-2226
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO II- Termo de Consentimento livre e esclarecido dos controles

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

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

NOME DA PESQUISA: "ESTUDO DE EXOSSOMOS NA INFECÇÃO PELO HTLV-I"

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

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

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

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

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

O que é HTLV?

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

Como ele é transmitido?

Versão 02 (26/03/2015)

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

O que ele causa?

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

Como você, participante, vai contribuir com esta pesquisa?

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

Porque esta pesquisa está sendo feita?

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

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

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

Versão 02 (26/03/2015)

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

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