

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação funcional de vesículas extracelulares na infecção pelo
vírus T-linfotrópico humano 1 (HTLV-1)**

Debora Glenda Lima de La-Roque

Ribeirão Preto
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação funcional de vesículas extracelulares na infecção pelo
vírus T-linfotrófico humano 1 (HTLV-1)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientada: Debora Glenda Lima de La-Roque

Orientadora: Dra. Simone Kashima Haddad

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado ou apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 14/09/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2021

LA-ROQUE,
D. G. L.

**Avaliação funcional de vesículas extracelulares na
infecção pelo vírus T-linfotrópico humano 1 (HTLV-1)**

MESTRADO
FCFRP-USP
2021

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.

LA-ROQUE, Debora Glenda Lima de

Avaliação funcional de vesículas extracelulares na infecção pelo vírus T-linfotrópico humano 1 (HTLV-1). Ribeirão Preto, 2021.

95 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Imunologia e Fisiopatologia.

Orientador: KASHIMA, Simone.

1. Retrovírus. 2. Retrovíroses. 3. Deltaretrovírus. 4. Doenças negligenciadas. 5. tax. 6. HBZ.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Debora Glenda Lima de La-Roque

Avaliação funcional de vesículas extracelulares na infecção pelo vírus T-linfotrópico humano 1 (HTLV-1)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Imunologia e Fisiopatologia

Orientador(a): Simone Kashima Haddad

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Agradecimentos

A Deus, pela vida e por todas as oportunidades de aprendizado que recebi até hoje;

À minha família, em especial aos meus pais, Rosiléa e Ednaldo, e ao meu namorado Lucas, pelo suporte e incentivo diários;

À Profa. Dra. Simone Kashima Haddad, pela oportunidade, confiança e paciência. Pelos ensinamentos, o carinho e inúmeros exemplos de perseverança e ética;

Aos meus queridos amigos do hemocentro, em especial do laboratório de biologia molecular, pelo constante apoio em experimentos e pela convivência: Jonathan, Ian, Péricles, Felipe, Roberta, Elaine, Josiane, Mariane e Evandra. Vocês tornaram essa jornada infinitamente mais leve;

Aos pacientes portadores do HTLV-1 que participaram desta pesquisa e aos médicos e enfermeiros do Ambulatório de Neurologia Tropical, em especial à Leonice, à Dra Ticiane e ao Dr Oswaldo, por acreditarem em mim e neste trabalho;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança a brincar à beira-mar, divertindo-me a descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continuou misterioso diante dos meus olhos.”

Isaac Newton

Resumo

La-Roque, D. G. L. **Avaliação funcional de vesículas extracelulares na infecção pelo vírus T-linfotrópico humano 1 (HTLV-1)**. 2021. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O vírus T-linfotrópico humano 1 (HTLV-1) é o agente etiológico da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) e da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP). O mecanismo que leva a estas manifestações clínicas tão distintas ainda não está elucidado. No entanto, sabe-se que os genes virais *tax* e *HTLV-1 basic leucine zipper factor* (HBZ) estão relacionados à infectividade viral e ao desenvolvimento de complicações neurológicas e hematológicas. Atualmente, existem evidências de que as células infectadas pelo HTLV-1 podem liberar vesículas extracelulares (VE) que participam da disseminação de partículas virais. Visando auxiliar a compreensão da patogênese do HTLV-1, este trabalho avaliou os níveis de expressão de *tax* e HBZ em VE provenientes do soro de indivíduos infectados, bem como o papel destas na modulação da resposta imune. As VE foram isoladas por precipitação polimérica e caracterizadas quanto ao diâmetro, a presença dos marcadores proteicos Alix, GAPDH e CD9 e ausência da proteína viral p19. A análise da expressão dos genes *tax* e HBZ foi realizada por PCR quantitativa e comparada à carga proviral (CPV) em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) dos portadores assintomáticos e sintomáticos para a HAM/TSP. Os níveis de transcritos dos genes *tax* e HBZ em VE foram correlacionados positivamente à CPV dos indivíduos HAM/TSP. Apenas os indivíduos com CPV acima de 6 mil cópias para cada 10^5 PBMC apresentaram transcritos virais em VE. Ademais, observou-se que, quando em níveis detectáveis, as unidades relativas de expressão (URE) de HBZ foram de 2 a 12 vezes maiores que as de *tax*. A seguir, a expressão e secreção de citocinas inflamatórias foi avaliada em PBMC de indivíduos saudáveis e de portadores do HTLV-1, expostas a crescentes doses de VE *tax*⁺ e HBZ⁺. A análise da expressão gênica por PCR quantitativa indicou aumento de transcritos da interleucina 8 (IL-8) em PBMC infectada de CPV baixa decorrentes do tratamento com VE infectadas. Este aumento também foi observado a nível proteico, confirmado pelo ensaio multiplex customizado *MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel* (Millipore), que avaliou a presença de citocinas inflamatórias no sobrenadante de cultivo. Interessantemente, o aumento de IL-8 chegou a níveis próximos ao observado em PBMC de CPV elevada. Estes achados indicam que a expressão de transcritos virais em VE derivadas do soro de portadores do HTLV-1 está relacionada à CPV apresentada pelo indivíduo. Adicionalmente, VE *tax*⁺ e HBZ⁺ podem induzir a produção de citocinas inflamatórias em pacientes de CPV reduzida, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento de sintomas na infecção pelo HTLV-1.

Palavras-chave: Retrovírus. Retrovíroses. Deltaretrovírus. Doenças negligenciadas. *tax*. HBZ.

Abstract

La-Roque, D. G. L. **Functional evaluation of extracellular vesicles in human T-cell lymphotropic virus 1 (HTLV-1) infection.** 2021. 93 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) is the etiologic agent of adult cell leukemia/lymphoma (ATL) and HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). One of the major questions in HTLV-1 studies is related to the understanding of causes that lead to different clinical manifestations. However, it is well known that the viral genes tax and HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) are related to viral infectivity and the development of neurological and hematological diseases. Currently, there is evidence that HTLV-1 infected cells can release extracellular vesicles (EV) involved in mechanisms of viral particles spreading. Therefore, we evaluated the expression levels of tax and HBZ viral transcripts in serum-derived EV from HTLV-1 carriers, as well as the role of these vesicles in the modulation of the immune response. Serum-derived EV were enriched by polymeric precipitation and characterized by size and protein composition (Alix, GAPDH and CD9), as well as the absence of p19 viral protein. The analysis of tax and HBZ gene expression was performed by quantitative PCR (qPCR) and compared to the proviral load (PVL) of asymptomatic carriers and HAM/TSP carriers. Three HAM/TSP carriers presented detectable levels of tax and HBZ transcripts in VE, and it was positively correlated to the PVL in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The detection of viral transcripts was only true in individuals with PVL higher than $6,000/10^5$ PBMC. When detectable, the expression units of HBZ presented a 2 to 12 fold increase over tax expression units. Next, the expression and secretion of inflammatory cytokines were evaluated in PBMC from healthy individuals and HTLV-1 carriers exposed to increasing doses of EV tax⁺ HBZ⁺. Gene expression analysis indicated an increase in interleukin 8 (IL-8) transcripts of HTLV-1-infected PBMC with low PVL, due to treatment with EV tax⁺ HBZ⁺. The increase was also observed at protein level in cell culture supernatant, confirmed by the multiplex assay MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Millipore). Interestingly, the increase in IL-8 levels were close to that seen in HTLV-1-infected PBMC with high PVL. Taken together, these findings indicate that the expression of viral transcripts in serum-derived EV of HTLV-1 carriers is related to the PVL presented by the infected individual. Additionally, EV tax⁺ HBZ⁺ can induce the production of inflammatory cytokines in patients with low PVL, which may be related to the development of symptoms in HTLV-1 infection.

Keywords: Retrovirus. Deltaretrovirus. Neglected diseases. tax. HBZ.

Lista de ilustrações

Figura 1. Representação de um <i>deltaretrovirus</i>	4
Figura 2. Expressão do genoma do HTLV-1 esquematizada.....	5
Figura 3. Representação da transmissão célula-célula induzida pelo HTLV-1...	8
Figura 4. Distribuição geográfica dos principais focos de infecção por HTLV-1 ao redor do mundo.....	9
Figura 5. Fluxograma representativo da desregulação de citocinas observada em indivíduos portadores do HTLV-1.....	13
Figura 6. Representação da biogênese e secreção das VE.....	15
Figura 7. Fluxograma da estratégia experimental.....	19
Figura 8. Representação gráfica da distribuição de idades dos infectados pelo HTLV-1.....	35
Figura 9. Fotodocumentação de eletroforese em gel de agarose a 1,5% das amostras de DNA dos participantes do estudo, investigadas quanto à presença dos genes virais LTR (fragmento 253 pb) e tax (fragmento 1.050 pb).....	37
Figura 10. Representação gráfica das curvas de amplificação e curvas padrão utilizadas para quantificação do número de cópias dos genes pol e β -globina humana por PCR em tempo real.....	38
Figura 11. Representação gráfica da distribuição da carga proviral de portadores do HTLV-1.....	39
Figura 12. Tamanho e concentração das partículas isoladas do soro avaliadas por análise e rastreamento de nanopartículas (NTA).....	41
Figura 13. Distribuição do tamanho e concentração das partículas isoladas do soro avaliadas por análise e rastreamento de nanopartículas (NTA).....	41
Figura 14. Avaliação da presença de marcadores proteicos comuns às VE por <i>Western blot</i>	42
Figura 15. Representação gráfica dos perfis de amplificação dos genes β -actina, tax e HBZ em VE isoladas do soro e na linhagem celular MT-2.....	43
Figura 16. Correlação entre a carga proviral e a expressão dos genes tax e HBZ em VE de portadores do HTLV-1.....	44
Figura 17. Análise da expressão da citocina pró-inflamatória IFN- γ em PBMC.....	46
Figura 18. Análise da expressão e secreção de citocinas inflamatórias em PBMC.....	47
Figura 19. Análise da expressão e secreção da citocina inflamatória IL-8 em PBMC infectadas pelo HTLV-1.....	47

Lista de tabelas

Tabela 1. Sequências de iniciadores <i>sense</i> e <i>antisense</i> para os genes tax e LTR do HTLV-1.....	23
Tabela 2. Sequências de sondas e iniciadores <i>sense</i> e <i>antisense</i> para a região pol e para o gene da β -globina humana.....	25
Tabela 3. Sequência de iniciadores <i>antisense</i> para os genes virais tax e HBZ e para o gene endógeno da β -actina.....	30
Tabela 4. Sequências de iniciadores e sondas específicos para os genes virais tax e HBZ.....	31
Tabela 5. Distribuição dos portadores do HTLV-1 quanto ao sexo e a idade.....	36
Tabela 6. Características clínicas e carga proviral dos portadores do HTLV-1...	40
Tabela 7. Níveis de expressão dos genes tax e HBZ em VE isoladas do soro comparados à CPV de portadores do HTLV-1.....	44

Lista de abreviaturas e siglas

°C	Grau centígrado
3'	Extremidade hidroxila-terminal dos ácidos nucleicos
5'	Extremidade fosfato-terminal dos ácidos nucleicos
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATLL	Leucemia/linfoma de células T do adulto
cDNA	DNA complementar
CMV	Corpos multivesiculares
CPV	Carga proviral
CTL	Linfócito T citotóxico
CXCL10	Ligante 10 de quimiocina com motivo C-X-C
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EBV	Vírus Epstein-Barr
GLUT-1	Transportador de glicose 1
gp	Glicoproteína
HAC	Portador assintomático do HTLV-1
HAM/TSP	Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1
HBZ	<i>HTLV-1 basic leucine zipper</i>
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSPG	Proteoglicanas heparan sulfato
HTLV	Vírus T-linfotrópico humano
ICAM1	Molécula de adesão intracelular 1
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-1α	Interleucina 1 alfa

IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IFN-α	Interferon alfa
IFN-γ	Interferon gama
LFA1	Antígeno 1 associado à função linfocitária
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MTOC	Centro organizador dos microtúbulos
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
NRP-1	Neuropilina-1
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas
pb	Pares de base
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pmol	picomol
PTLV	Vírus T-linfotrópico de primatas
RNA	Ácido ribonucleico
sIL-6r	Receptor de IL-6 solúvel
STLV	Vírus T-linfotrópico de símios
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
V	Volts
VE	Vesículas extracelulares
μg	Micrograma

μL	Microlitro
μM	Micromolar

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de ilustrações	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1 Introdução	1
1.1 O HTLV-1.....	1
1.1.1 Histórico e aspectos gerais do HTLV-1	1
1.1.2 Estrutura e organização genômica do HTLV-1	3
1.1.3 Ciclo de replicação e transmissão viral	7
1.1.4 Epidemiologia do HTLV-1	9
1.1.5 Manifestações Clínicas	10
1.1.5.1 Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1.....	11
1.2 Vesículas extracelulares.....	14
1.2.1 VE e infecções virais	16
1.2.1.1 Vesículas extracelulares na infecção pelo HTLV-1.....	17
2 Objetivos	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 Material e Métodos	19
3.1 Casuística.....	19
3.1.1 Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP)	20
3.1.2 Hemocentro de Ribeirão Preto	20
3.2 Aspectos éticos.....	21
3.3 Fracionamento de amostras.....	21
3.4 Extração de DNA.....	22
3.5 Detecção do DNA proviral.....	23
3.6 Quantificação absoluta da carga proviral.....	24
3.7 Isolamento de vesículas extracelulares.....	25
3.7.1 Isolamento de VE por ultracentrifugação	26
3.7.2 Isolamento de VE por precipitação polimérica	26

3.8 Caracterização de VE.....	26
3.8.1 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	27
3.8.2 Análise de marcadores proteicos	27
3.8.2.1 Extração de proteínas.....	27
3.8.2.2 Quantificação de proteínas.....	28
3.8.2.3 SDS-PAGE.....	28
3.8.2.4 Western Blot.....	28
3.9 Avaliação da expressão de genes virais em EV.....	29
3.9.1 Extração de RNA de EV	29
3.9.2 Reação da transcriptase reversa	30
3.9.3 PCR quantitativa	30
3.9.3.1 Detecção do gene endógeno da β -actina.....	30
3.9.3.2 Detecção dos genes virais tax e HBZ.....	31
3.10 Ensaio de imunoestimulação.....	32
3.10.1 Preparo de soro fetal bovino depletado de exossomos	32
3.10.2 Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)	32
3.10.3 Ensaio de imunoestimulação das PBMC por VE	32
3.10.4 Análise da expressão de citocinas inflamatórias	33
3.10.5 Quantificação de citocinas	34
3.11 Análises estatísticas.....	34
4 Resultados	35
4.1 Caracterização dos portadores do HTLV-1.....	35
4.2 Detecção do DNA proviral do HTLV-1.....	36
4.3 Análise da carga proviral.....	37
4.4 Caracterização das VE.....	41
4.4.1 Tamanho e concentração	41
4.4.2 Marcadores proteicos	42
4.5 Quantificação relativa de tax e HBZ em VE.....	42
4.6 Ensaio de imunoestimulação.....	45
5 Discussão	48
6 Conclusões	54
Referências	55

1 Introdução

O termo vírus vem do latim *virus* e significa veneno/toxina. O termo é dado pois acreditava-se que muitas doenças eram causadas por venenos. Atualmente, sabe-se que os vírus são parasitas intracelulares considerados os menores agentes infecciosos que existem e que, uma vez dentro de uma célula hospedeira, são capazes de direcionar a maquinaria celular para a produção de novos vírus (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; LODISH et al., 2000).

Dentre os vírus existentes, os retrovírus distinguem-se pela capacidade de incorporar o seu material genético no genoma da célula hospedeira de forma definitiva. Uma vez inserido, o genoma viral passa a ser chamado de provírus e é herdado pelas células-filhas resultantes da divisão mitótica da célula infectada. Em vertebrados, a presença de provírus pode representar até 10% do DNA genômico. Contudo, a maioria destes já não é capaz de produzir partículas infecciosas em decorrência das sucessivas mutações sofridas ao longo das gerações (ICTV, 2011).

As retroviroses estão associadas a diversas patologias, tais como neoplasias, imunodeficiências e doenças autoimunes (ICTV, 2011). Neste trabalho, trataremos do vírus T-linfotrópico humano 1 (*human T-lymphotropic virus 1, HTLV-1*), o agente causal de doenças linfoproliferativas e neurodegenerativas.

1.1 O HTLV-1

1.1.1 Histórico e aspectos gerais do HTLV-1

O primeiro relato do HTLV-1 foi realizado por um grupo americano que isolou a partícula infecciosa de um caso de linfoma cutâneo de células T (POIESZ et al., 1980). No ano seguinte, Hinuma e colaboradores descreveram a presença de um antígeno desconhecido e o associaram aos numerosos casos de leucemia de células T do adulto (*adult T-cell leukemia, ATL*) (HINUMA et al., 1981). Como ambos os trabalhos referiam-se ao mesmo vírus, o nome “vírus da leucemia humana de

células T” foi conferido ao agente etiológico e “leucemia de células T do adulto” foi concedido à doença (POPOVIC et al., 1982). Em 1983, o termo “leucemia” foi substituído por “linfotrópico” devido à adição do vírus que hoje conhecemos como vírus da imunodeficiência humana 1 (*human immunodeficiency virus 1*, HIV-1) ao grupo dos HTLV (GALLO et al., 1983). Atualmente, o HIV-1 encontra-se separado dos demais HTLV quanto a sua taxonomia, mas o termo “linfotrópico” permanece na sigla.

A infecção pelo HTLV-1 foi ainda associada a manifestações neurológicas identificadas como paraparesia espástica tropical (*tropical spastic paraparesis*, TSP), na Martinica, e como mielopatia associada ao HTLV-1 (*HTLV-1 associated myelopathy*, HAM), no Japão (GESSAIN et al., 1985; OSAME et al., 1987). Contudo, ambas as comorbidades foram reconhecidas como iguais, sendo então chamadas de HAM/TSP (AKIZUKI et al., 1987).

Paralelamente, um vírus com perfil antigênico significativamente diferente foi identificado a partir de um paciente com quadro clínico de leucemia pilosa de células T, que apresentou reatividade cruzada com antígenos do HTLV-1. Este vírus foi adicionado ao grupo dos HTLV, sendo então chamado de HTLV-2 (KALYANARAMAN et al., 1982). Apesar de não ser diretamente associado a manifestações clínicas, alguns trabalhos o relacionam ao desenvolvimento de alterações neurológicas e hematológicas (ORLAND et al., 2003; REN et al., 2012).

Posteriormente, os HTLV-3 e HTLV-4 foram isolados de pacientes assintomáticos na mesma região geográfica da República dos Camarões (CALATTINI et al., 2005; WOLFE et al., 2005). Apesar de não estarem associados ao desenvolvimento de doenças, o HTLV-3 apresenta o oncogene capaz de promover a proliferação de células T *in vitro* semelhante ao HTLV-1, ao contrário do HTLV-4, que é filogeneticamente distinto dos demais HTLV (ANYANWU et al., 2018).

Atualmente, os HTLV são classificados como *deltaretrovirus* pertencentes ao grupo dos PTLV (*primate T-lymphotropic viruses*), utilizado para agrupar retrovírus que têm como hospedeiros os primatas humanos e não humanos (WALKER et al.,

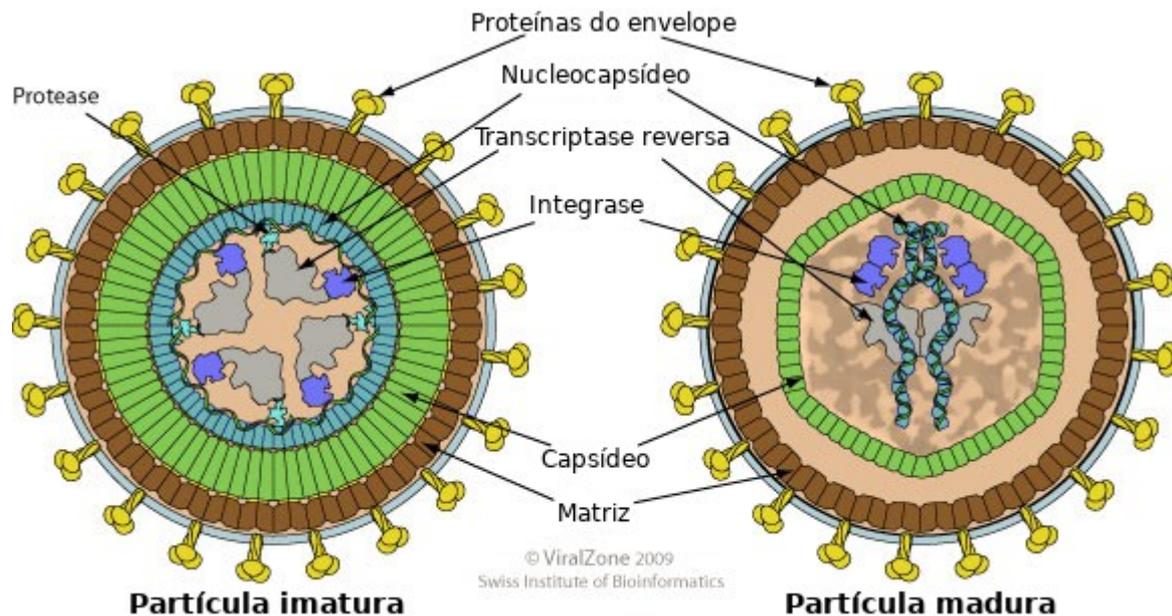
2019). Tais vírus diferem entre si quanto à presença de oncogenes virais, propriedades antigênicas, quanto ao hospedeiro e patogenicidade (ICTV, 2011).

Dentro dos PLTV, os HTLV-1, HTLV-2 e HTLV-3 encontram-se juntamente aos retrovírus T-linfotrópicos de símios, os STLV (*simian T-lymphotropic virus*) dos tipos um, dois e três (ICTV, 2011). Análises filogenéticas entre o HTLV-1 e o STLV-1 mostram similaridade maior que 97% entre os genomas (WOLFE et al., 2005). Este dado sustenta a hipótese de que a infecção pelo HTLV-1 originou-se do contato com primatas não-humanos por meio da caça, do consumo da carne e da criação como animais de estimação (WOLFE et al., 2004). Além do HTLV-1, os HTLV-2 e HTLV-3 também possuem origem relacionada a outros retrovírus encontrados em primatas não-humanos - os STLV-2 e STLV-3. O HTLV-4 é o tipo de HTLV com descrição mais recente, com origem desconhecida e ainda não reconhecido como espécie (SALEMI; DESMYTER; VANDAMME, 2000; WOLFE et al., 2005; ICTV, 2011).

1.1.2 Estrutura e organização genômica do HTLV-1

Os vírions do HTLV-1 são de estrutura esférica e pleomórfica com 100 a 120 nanômetros (nm) de diâmetro, em média. Compõe-se por uma bicamada lipídica oriunda da célula hospedeira, um capsídeo de simetria icosaédrica e um nucleocapsídeo composto por duas fitas simples de RNA, idênticas e de polaridade positiva, encapsuladas com as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (Figura 1) (BOUVARD et al., 2009; FUNDAÇÃO HEMOMINAS, 2015).

Figura 1 – Representação de um *deltaretrovirus*.



Partículas virais do HTLV-1 são envelopadas pela bicamada lipídica da célula hospedeira, onde ancoram-se as proteínas do envelope gp21 (transmembrana) e gp46 (superfície). A matriz viral, o capsídeo e o nucleocapsídeo são compostos por subunidades das proteínas p19, p24 e p15, respectivamente. No centro da partícula encontram-se o material genético e as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease. Fonte: Adaptado de HULO et al., 2011.

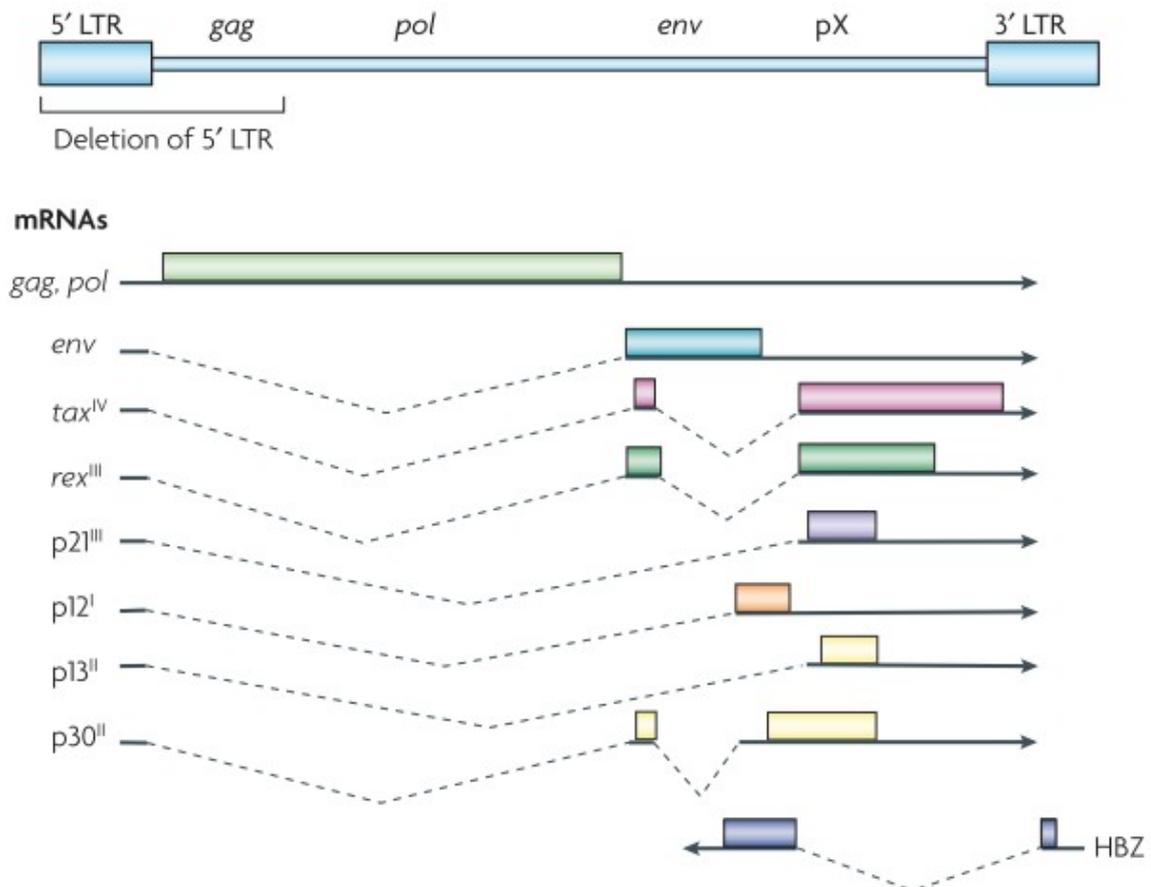
O genoma do HTLV-1 apresenta 9.032 pares de base (pb) onde estão inseridos os genes estruturais gag, pol e env, comuns aos demais retrovírus. Além destes, o HTLV-1 apresenta a região pX e duas regiões não-codificadoras LTR (*long terminal repeats*). A região pX é composta por genes regulatórios e acessórios, enquanto que as regiões LTR flanqueiam o DNA proviral e estão envolvidas na integração do provírus ao genoma da célula hospedeira, bem como na regulação da transcrição do genoma proviral (SEIKI et al., 1983).

Algumas espécies de RNA mensageiro (mRNA) são transcritas a partir da região 5' LTR no DNA proviral (Figura 2). A transcrição completa da fita origina tanto o RNA genômico empacotado nos novos vírions quanto um precursor poliproteico. Deste, originam-se as proteínas de matriz, do capsídeo e do nucleocapsídeo, referentes ao gene gag (proteínas p19, p24 e p15, respectivamente). Os genes pol e pro (codificado por um desvio de leitura entre os genes gag e pol) codificam as enzimas protease, transcriptase reversa e integrase. Estas são responsáveis pela clivagem de proteínas, pela síntese do DNA viral e pela integração do DNA viral no

genoma da célula hospedeira, respectivamente (BOUVARD et al., 2009; FUNDAÇÃO HEMOMINAS, 2015).

Após uma única etapa de processamento do mRNA viral é codificado o produto do gene *env*, que é clivado pela ação de protease celular e dá origem à glicoproteína transmembrana gp21 e à proteína de superfície gp46. De forma alternativa, as proteínas regulatórias da região pX (*tax*, *rex*, p12, p13 e p30) são codificadas pela remoção de um ou dois íntrons deste mesmo RNA subgenômico, e contribuem para a infectividade e expressão gênica do HTLV-1 (BOUVARD et al., 2009; FUNDAÇÃO HEMOMINAS, 2015). Além destes, o gene viral HBZ (*HTLV-1 basic leucine zipper-factor*) é descrito como o único gene com promotor na região 3' LTR, responsável pela infrarregulação da transcrição viral (Figura 2) (GAUDRAY et al., 2002).

Figura 2 – Expressão do genoma do HTLV-1 esquematizada.



Na figura, observa-se o genoma flanqueado pelas regiões LTR e os transcritos genômicos e subgenômicos (representados pelas setas na porção inferior da imagem). A extremidade 5' LTR

apresenta a região promotora para a maioria dos genes do HTLV-1, e portanto se mostra frequentemente deletada ou silenciada. Por outro lado, a porção 3' LTR apresenta a região promotora para o gene HBZ e permanece intacta nos casos de infecção com manifestações clínicas. Fonte: MATSUOKA; JEANG, 2007.

Atualmente, os genes tax e HBZ são reconhecidos como potenciais marcadores para o avanço da infecção pelo HTLV-1 por estarem associados à infectividade viral, a expansão e a sobrevivência de células leucêmicas (ENOSE-AKAHATA; VELLUCCI; JACOBSON, 2017). Tax é uma proteína nuclear altamente imunogênica, responsável por alterações no ciclo celular e na via clássica de sinalização do fator nuclear kappa B (NFκB), além de promover a transcrição viral em LTR 5' (Figura 4) (GRASSMANN; ABOUD; JEANG, 2005). Ademais, Tax é capaz de alterar a função de células T regulatórias envolvidas na manutenção da autotolerância do organismo, causando desregulação imunológica observada em indivíduos sintomáticos na infecção pelo HTLV-1 (ENOSE-AKAHATA; VELLUCCI; JACOBSON, 2017). Neste sentido, células infectadas capazes de “desligar” a expressão de Tax têm vantagens no escape às respostas do sistema imunológico.

A proteína HBZ atua como antagonista para Tax, suprimindo a transcrição de genes virais com região promotora em LTR 5' e a via clássica de NFκB (Figura 4) (MATSUOKA; JEANG, 2007; ENOSE-AKAHATA; VELLUCCI; JACOBSON, 2017). Ademais, transcritos de HBZ em sua estrutura secundária desempenham atividades de promoção e manutenção do processo oncogênico mediado pelo HTLV-1 (MATSUOKA; JEANG, 2007). Também é válido ressaltar que a proteína HBZ é raramente detectável em células mononucleares de sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) de pacientes que apresentam complicações neurológicas medidas pelo HTLV-1 (SHIOHAMA et al., 2016), o que sugere um controle da tradução de HBZ para escape às respostas imunológicas específicas para esta proteína, como forma de atuar na persistência viral.

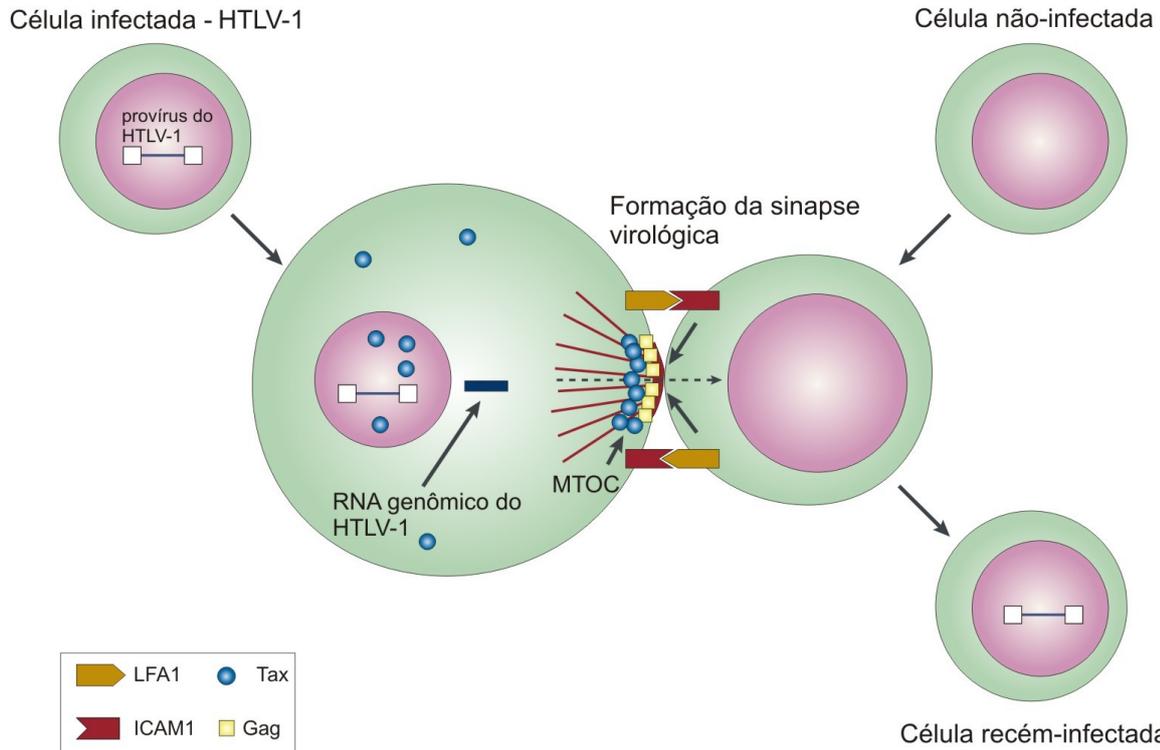
Neste contexto, este trabalho está direcionado à análise da expressão dos genes Tax e HBZ, pois acredita-se que o estudo destes genes virais é capaz de elucidar parte dos mecanismos de patogênese do HTLV-1.

1.1.3 Ciclo de replicação e transmissão viral

Os vírions do HTLV-1 infectam preferencialmente linfócitos T CD4 e CD8 positivos (ETOH et al., 1997). As proteoglicanas heparan sulfato (HSPG) e neuropilina-1 (NRP-1), junto ao transportador de glicose 1 (GLUT-1), interagem com a glicoproteína de superfície viral gp46 e facilitam a penetração do vírus em novas células (PINON et al., 2003; COSKUN; SUTTON, 2005; JONES et al., 2005; GHEZ et al., 2006). A transcrição do RNA viral em DNA ocorre no interior do cerne viral, mediada pela enzima transcriptase reversa. O DNA é transportado para o núcleo da célula hospedeira e inserido no genoma celular pela ação da enzima integrase. A partir deste ponto, a multiplicação do vírus é mediada pela maquinaria da célula hospedeira, responsável por realizar a síntese de RNA a partir do DNA proviral, a tradução de proteínas virais, a montagem de vírions e a liberação de novos vírus para o espaço extracelular (MANEL et al., 2005).

Entretanto, as partículas virais do HTLV-1 são raramente detectáveis no plasma ou soro dos portadores da infecção (PIQUE; JONES, 2012). Isto ocorre pois a propagação da infecção no organismo hospedeiro dá-se principalmente pela expansão clonal das células infectadas e pela formação de uma “sinapse virológica” (contato célula-célula induzido pelo vírus, Figura 3) (ETOH et al., 1997; IGAKURA et al., 2003). Neste contexto, a ação da enzima transcriptase reversa é reduzida, o que garante a grande estabilidade genética observada no HTLV-1 (BOUVARD et al., 2009).

Figura 3 – Representação da transmissão célula-célula induzida pelo HTLV-1.



A interação entre a molécula de adesão intracelular ICAM1 e o antígeno associado à função linfocitária LFA1 inicia a sinapse virológica. A partir deste contato, ocorre a formação de um centro organizador dos microtúbulos (*microtubule-organizing center*, MTOC) próxima à junção, promovida por Tax. Com isso, moléculas do complexo gag e do RNA genômico do HTLV-1 acumulam-se na sinapse formada e infectam a nova célula. Fonte: Adaptado de MATSUOKA; JEANG, 2007.

O HTLV-1 pode ser transmitido pelas vias vertical, parenteral e sexual. Em cada uma destas vias é necessário que haja a transmissão de células sanguíneas, pois a transfusão de componentes acelulares do sangue (plasma ou soro) não resulta em soroconversão do indivíduo transfundido (MANNNS et al., 1992; DONEGAN et al., 1994; PAIVA; CASSEB, 2014).

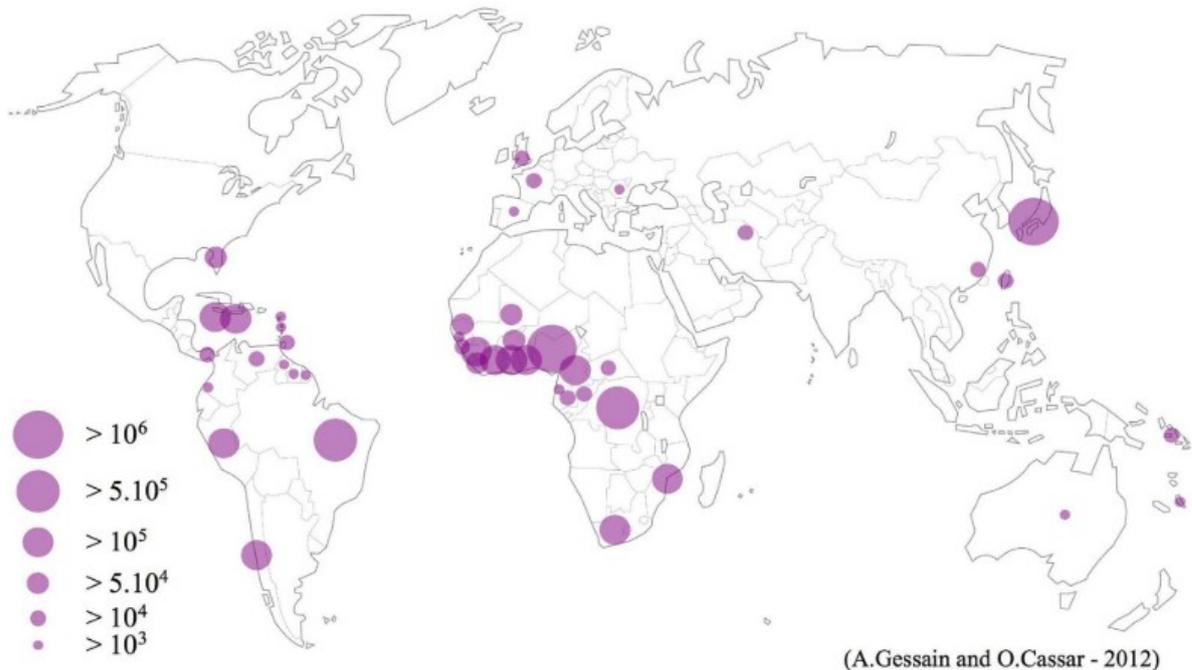
A transmissão vertical do HTLV-1 está associada à amamentação prolongada, à via transplacentária e ao parto. A via parenteral está associada principalmente à transfusão de sangue e ao compartilhamento de agulhas contaminadas durante o uso de drogas injetáveis, enquanto que a transmissão sexual está associada à multiplicidade de parceiros e às relações sexuais desprotegidas (PAIVA; CASSEB, 2014). Em áreas endêmicas, a infecção pelo

HTLV-1 é perpetuada principalmente pelas relações sexuais desprotegidas e pela amamentação.

1.1.4 Epidemiologia do HTLV-1

Embora presente em todos os continentes, o HTLV-1 é considerado endêmico no Japão, África subsaariana, América do Sul e Caribe (GESSAIN; CASSAR, 2012) (Figura 4). Estima-se que exista entre 5 e 10 milhões de pessoas infectadas ao redor mundo. No entanto, esse número pode ser ainda maior, devido à ausência de estudos epidemiológicos em países com alta densidade demográfica, como China e Índia. Além disso, a maioria desses estudos é realizada em populações específicas, como doadores de sangue, gestantes e pacientes hospitalizados que podem não ser capazes de representar a população geral das regiões investigadas (GESSAIN; CASSAR, 2012). Dessa forma, a infecção por HTLV-1 pode ser considerada uma doença negligenciada em todo o mundo.

Figura 4 – Distribuição geográfica dos principais focos de infecção por HTLV-1 ao redor do mundo.



O gráfico é montado a partir de dados coletados de 1,5 bilhões de indivíduos que residem em áreas endêmicas do mundo, dentre gestantes, doadores de sangue e outras populações específicas. Fonte: GESSAIN; CASSAR, 2012.

O Brasil é considerado um dos países com maior número absoluto de infectados, com cerca de 2,5 milhões de portadores (CATALAN-SOARES et al., 2005). Além disso, estima-se que ocorram 3.024 novos casos de transmissão vertical anualmente no país (ROSADAS et al., 2018). As menores taxas de soroprevalência em candidatos a doadores de sangue são observadas nas capitais da região sul, que tendem a aumentar em direção às regiões norte e nordeste do país. Dentre os estados com maior soroprevalência destacam-se o Maranhão, Bahia, Pará e Pernambuco, com soroprevalências de 0,75 a 1% (CATALAN-SOARES et al., 2005). Contudo, estudos representativos de transeuntes das capitais da Bahia e do Pará mostram uma prevalência de 1,7% (DOURADO et al., 2003) e 2% (SILVA et al., 2018) para o HTLV-1, respectivamente, o que indica a necessidade de maiores estudos sobre a epidemiologia do vírus.

1.1.5 Manifestações Clínicas

A maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanecem como portadores assintomáticos da infecção durante toda a vida. Entretanto, alguns estudos relatam a possibilidade de aproximadamente 3% desses indivíduos desenvolverem a HAM/TSP e 4% desenvolverem a ATLL (MURPHY et al., 1989; TOSSWILL et al., 2000). Um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças associadas é o aumento da carga proviral (CPV). Entretanto, em pacientes HAM/TSP têm sido observadas algumas divergências quanto aos valores de CPV e desenvolvimento da doença (YARI et al., 2014). Tal observação reflete a necessidade de um marcador biológico específico e eficaz que indique o estágio atual de desenvolvimento da doença.

Além das duas principais doenças associadas ao HTLV-1, a infecção também está relacionada ao surgimento de outras complicações e coinfeções, tais como a uveíte, dermatite infectiva, estromiloidíase, tuberculose e escabiose (LAGRENADE et al., 1990; MOCHIZUKI et al., 1992; BERGMAN et al., 1999; MARINHO et al., 2005; SILVA et al., 2021). Por ser consequência de um processo inflamatório tal qual a HAM/TSP, o desenvolvimento de uveíte pode indicar o avanço da infecção por

HTLV-1 em direção a HAM/TSP (MERLE et al., 2002). Por sua vez, a dermatite infectiva está associada a infecção por *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus beta haemolyticus* e estimula uma resposta imunológica semelhante à observada em pacientes HAM/TSP (LAGRENADE et al., 1990; NASCIMENTO et al., 2009). Entretanto, existem relatos de que esta condição pode evoluir tanto para HAM/TSP quanto para ATLL (TSCHACHLER; FRANCHINI, 1998; PRIMO et al., 2005). Quanto às demais infecções relacionadas ao HTLV-1, estudos mais aprofundados são necessários para que haja a confirmação destas associações.

1.1.5.1 Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1

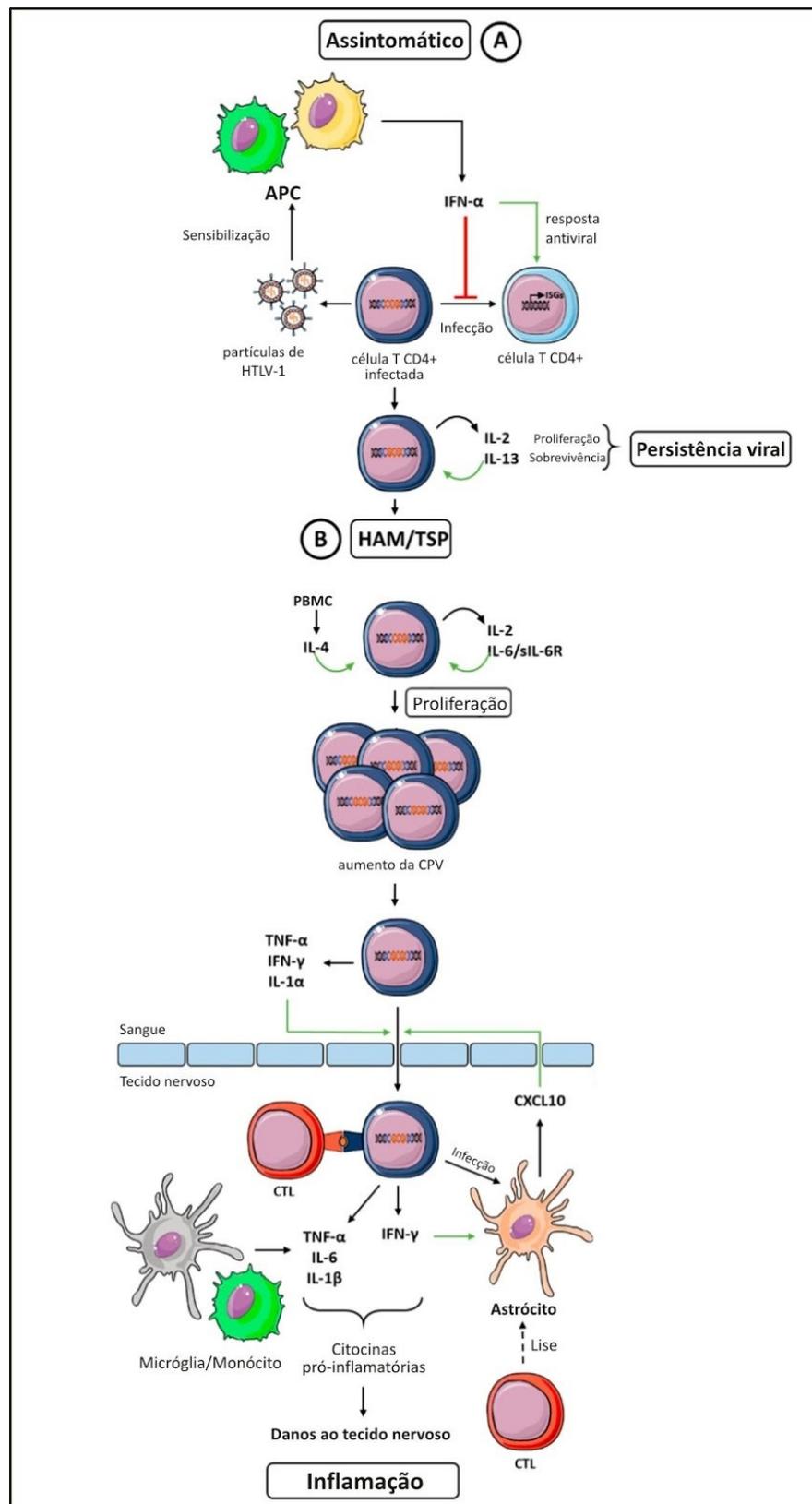
A paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) é uma complicação neurológica resultante de uma desmielinização crônica e progressiva, em decorrência de um processo inflamatório exacerbado que afeta a medula espinhal e a substância branca do cérebro. A doença se manifesta principalmente em mulheres entre a quarta e quinta décadas de vida (RIBAS; MELO, 2002). O diagnóstico desta condição é realizado por avaliação clínica dos sintomas concomitantemente com testes sorológicos e/ou moleculares que comprovem a infecção por HTLV-1 no sangue e no líquido dos pacientes (CASTRO-COSTA et al., 2005).

Estima-se que 56% dos brasileiros infectados pelo HTLV-1 apresentam sinais e sintomas neurológicos que podem evoluir para a HAM/TSP (TANAJURA et al., 2015). Dentre estes, a disfunção vésico-intestinal (urgência ou incontinência urinária e/ou constipação intestinal) e a disfunção erétil podem ser um dos primeiros sintomas, que evoluem para diminuição gradual da força muscular e da espasticidade, ocasionando distúrbios de marcha, fraqueza, enrijecimento dos membros inferiores e comprometimento do equilíbrio. A progressão da doença diminui gradativamente a capacidade de deambular até a necessidade de apoio (uso de andador, bengala ou cadeira de rodas), que pode ocorrer dentro de meses ou décadas (RIBAS; MELO, 2002).

Os pacientes monossintomáticos que apresentam urgência ou incontinência urinária, espasticidade muscular ou hiperreflexia em membros inferiores são descritos como não pertencentes ao grupo de portadores assintomáticos da infecção ou ao grupo de pacientes com diagnóstico completo de HAM/TSP (TANAJURA et al., 2015; GUERRA et al., 2018). Para estes pacientes são utilizados diferentes termos, como “suposto HAM/TSP” ou “provável HAM/TSP” (STARLING et al., 2015; TANAJURA et al., 2015; HAZIOT et al., 2019).

Os indivíduos portadores da HAM/TSP apresentam níveis elevados das citocinas inflamatórias IL-4, IL-6, IL-8, interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no plasma, quando comparados a indivíduos saudáveis (FUTSCH et al., 2018). Além destas, observam-se também elevados níveis do imunomodulador IL-10 no soro de pacientes HAM/TSP. Esta desregulação de citocinas sustenta o processo inflamatório crônico observado nesses indivíduos e contribui para a manifestação dos sintomas da HAM/TSP (KAGDI et al., 2018). A Figura 5 apresenta um fluxograma esquematizado sobre a desregulação das citocinas envolvidas na resposta inflamatória de portadores do HTLV-1 assintomáticos e sintomáticos para a HAM/TSP.

Figura 5 – Fluxograma representativo da desregulação de citocinas observada em indivíduos portadores do HTLV-1.



(A) O estado assintomático ocorre no início da infecção e pode durar a vida toda. Novas partículas do HTLV-1 sensibilizam células apresentadoras de antígeno e dão início à resposta inflamatória. Neste estado, as citocinas IFN- α , IL-2 e IL-13 estão envolvidas no controle antiviral, na proliferação e na sobrevivência das células infectadas. (B) Na evolução para a HAM/TSP, a proliferação das células infectadas causa aumento da CPV. A presença de outras citocinas pró-inflamatórias nessa fase da infecção (IFN- γ , IL-1, TNF- α , CXCL10 e IL-6 auxiliam na transposição da barreira hematoencefálica por células HTLV-1-positivas, o que contribui para o estado neuroinflamatório crônico e os danos ao tecido nervoso observados nos portadores da HAM/TSP. Fonte: Adaptado de Futsch et al., 2018.

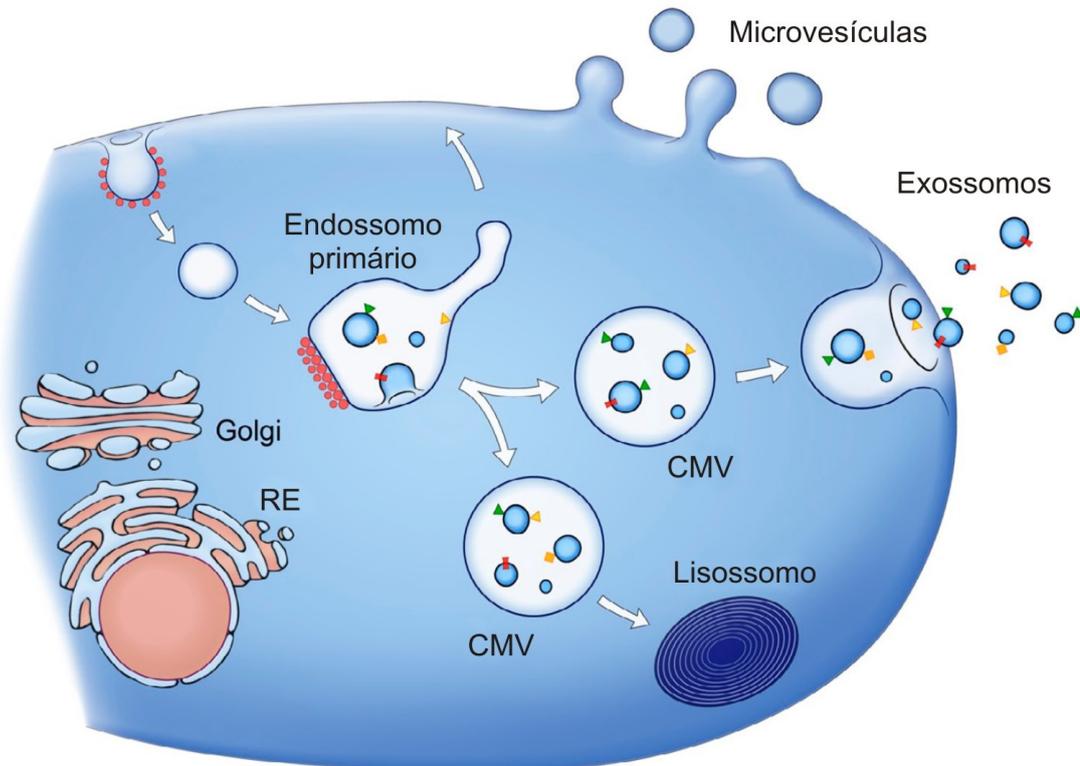
Neste estudo, a HAM/TSP receberá um maior enfoque por ser a doença associada ao vírus de estudo mais observada no Brasil e por conferir uma alta morbidade aos indivíduos acometidos por esta infecção (TANAJURA et al., 2015).

1.2 Vesículas extracelulares

O presente trabalho investiga o papel de vesículas extracelulares na infecção pelo HTLV-1. “Vesículas extracelulares” (VE) é o termo utilizado para definir partículas secretadas por organismos procariontes e eucariontes, delimitadas por uma bicamada lipídica, e incapazes de replicarem-se (THÉRY et al., 2018). São compostas principalmente por proteínas do citosol e de membrana, lipídios e ácidos nucleicos. No entanto, seu conteúdo pode variar de acordo com o tipo de VE e com a célula progenitora (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014).

As VE são comumente classificadas de acordo com a sua biogênese e tamanho em: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Os exossomos possuem de 40 a 140 nanômetros de diâmetro e são liberados para o espaço extracelular após a fusão dos corpos multivesiculares que os contêm com a membrana plasmática da célula. As microvesículas possuem de 50 a 1000 nanômetros de diâmetro e são originadas diretamente da membrana plasmática, enquanto que corpos apoptóticos são resquícios de células que iniciaram o processo de morte celular programada (Figura 6) (EL ANDALOUSSI et al., 2013).

Figura 6 – Representação da biogênese e secreção das VE.



As microvesículas brotam diretamente da membrana plasmática da célula. Ao contrário, a formação dos exossomos se inicia pela invaginação da membrana plasmática e formação de endossomos primários. Endossomos geram corpos multivesiculares (CMV) por invaginação da pequena membrana que os delimita, e podem liberar seu conteúdo (exossomos) para o espaço extracelular pela fusão com a membrana plasmática da célula. De forma alternativa, os CMV podem fundir-se com lisossomos para degradação das moléculas contidas. Fonte: Adaptado de RAPOSO; STOOORVOGEL, 2013.

As VE representam um importante mecanismo de comunicação entre células de forma parácrina e endócrina (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014). Estas partículas são capazes de modular o sistema imunológico e promover o reparo de tecidos, além de contribuir para a cascata de coagulação e para a plasticidade sináptica (EL ANDALOUSSI et al., 2013). Estes processos também podem contribuir para o desenvolvimento de doenças, atuando na progressão de tumores, na indução de metástase, no transporte de antígenos através da barreira hematoencefálica e no transporte de conteúdo viral para células saudáveis (PEINADO et al., 2012; RAK; GUHA, 2012; ANDERSON et al., 2018; SUKRITI et al., 2019).

1.2.1 VE e infecções virais

Os vírus, em sua maioria, são similares às VE quanto à biogênese, à forma de entrada nas células e à transferência de materiais genéticos entre células (CRENSHAW et al., 2018). A exemplo disto, na infecção pelo HIV, observa-se que o vírus utiliza a via endossomal para aquisição da bicamada lipídica da célula como envelope, bem como para liberação das partículas virais para o espaço extracelular (IPINMOROTI; MATTHEWS, 2020).

Durante as infecções virais, o conteúdo das VE é alterado de forma a atuar na restrição ou na propagação da infecção para células saudáveis, por ser considerada uma forma de disseminar antígenos (CRENSHAW et al., 2018; YOSHIKAWA et al., 2019). Na infecção pelo vírus Ebola, observa-se a presença de proteínas virais em VE liberadas por células infectadas (PLEET et al., 2019). Já na infecção pelo vírus da hepatite C (*hepatitis C virus*, HCV), as VE são capazes de transportar o genoma completo do vírus para células saudáveis e estabelecer uma nova infecção, ao mesmo tempo que escapam da resposta imunológica humoral (RAMAKRISHNAIAH et al., 2013). Por sua vez, VE oriundas de células infectadas pelo vírus Epstein-Barr (*Epstein-Barr virus*, EBV) são capazes de induzir um estado anérgico em células T, de forma a proteger as células tumorais virais da resposta imunológica (GUENAT et al., 2017).

Em retrovíroses, as VE desempenham papéis na patogênese da infecção, promovendo a infecção de novas células e o desenvolvimento de respostas imunológicas, pois carregam ácidos nucleicos e proteínas virais que desencadeiam diferentes processos nas células receptoras (REZAIE et al., 2021). A exemplo disto, estudos na infecção pelo HIV mostram que a liberação da proteína viral Nef em VE é capaz de estimular a liberação de citocinas inflamatórias que promovem a produção de radicais livres e levam à excitotoxicidade, contribuindo para o desenvolvimento de comorbidades neurológicas (IPINMOROTI; MATTHEWS, 2020). Ademais, a proteína Nef atua na supressão da resposta imune antiviral, contribuindo para a evasão da resposta imunológica (IPINMOROTI; MATTHEWS, 2020).

1.2.1.1 Vesículas extracelulares na infecção pelo HTLV-1

Até o momento, estudos envolvendo VE na infecção pelo HTLV-1 mostraram a presença da proteína viral Tax e dos transcritos de tax, HBZ e env em VE isoladas do soro e do líquido de pacientes HAM/TSP, bem como do sobrenadante de cultura de linhagens celulares infectadas (JAWORSKI et al., 2014; SALUSTIANO, 2016; ANDERSON et al., 2018; PINTO et al., 2019). Ao contrário do que é observado na infecção por HCV, as VE liberadas por células infectadas pelo HTLV-1 não são infecciosas. Entretanto, estas partículas são capazes de promover o contato entre uma célula infectada e uma célula saudável e elevar a infectividade viral, uma vez que a transmissão do HTLV-1 é mediada principalmente pelo contato célula-célula (PINTO et al., 2019).

Em outros estudos funcionais, observou-se que VE Tax-positivas isoladas do líquido de pacientes HAM/TSP e do sobrenadante de cultura de linhagem celular infectada são capazes de induzir uma resposta imunológica específica para o HTLV-1, o que pode estar relacionado ao processo inflamatório crônico observado em portadores da HAM/TSP (ANDERSON et al., 2018; OTAGUIRI et al., 2018). Por sua vez, VE Tax-positivas isoladas de células leucêmicas oriundas de paciente portador da ATLL mostraram-se capazes de causar alterações funcionais em células estromais mesenquimais de forma a favorecer o desenvolvimento das células leucêmicas (EL-SAGHIR et al., 2016).

Por fim, apesar das crescentes evidências de que células infectadas pelo HTLV-1 podem liberar VE que participam de mecanismos de disseminação viral e patogênese, poucos são os estudos *in vivo*. Acreditamos que o estudo funcional de VE circulantes em portadores do HTLV-1 poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos de patogênese da infecção, bem como no prognóstico e/ou diagnóstico da doença. Neste sentido, a hipótese deste trabalho é de que a presença dos genes tax e HBZ em VE circulantes modula a resposta imunológica do hospedeiro frente a infecção pelo HTLV-1 e está relacionada à progressão das doenças associadas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os níveis de expressão dos genes tax e HBZ em VE provenientes do soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e seu papel na modulação da resposta imunológica nesta infecção.

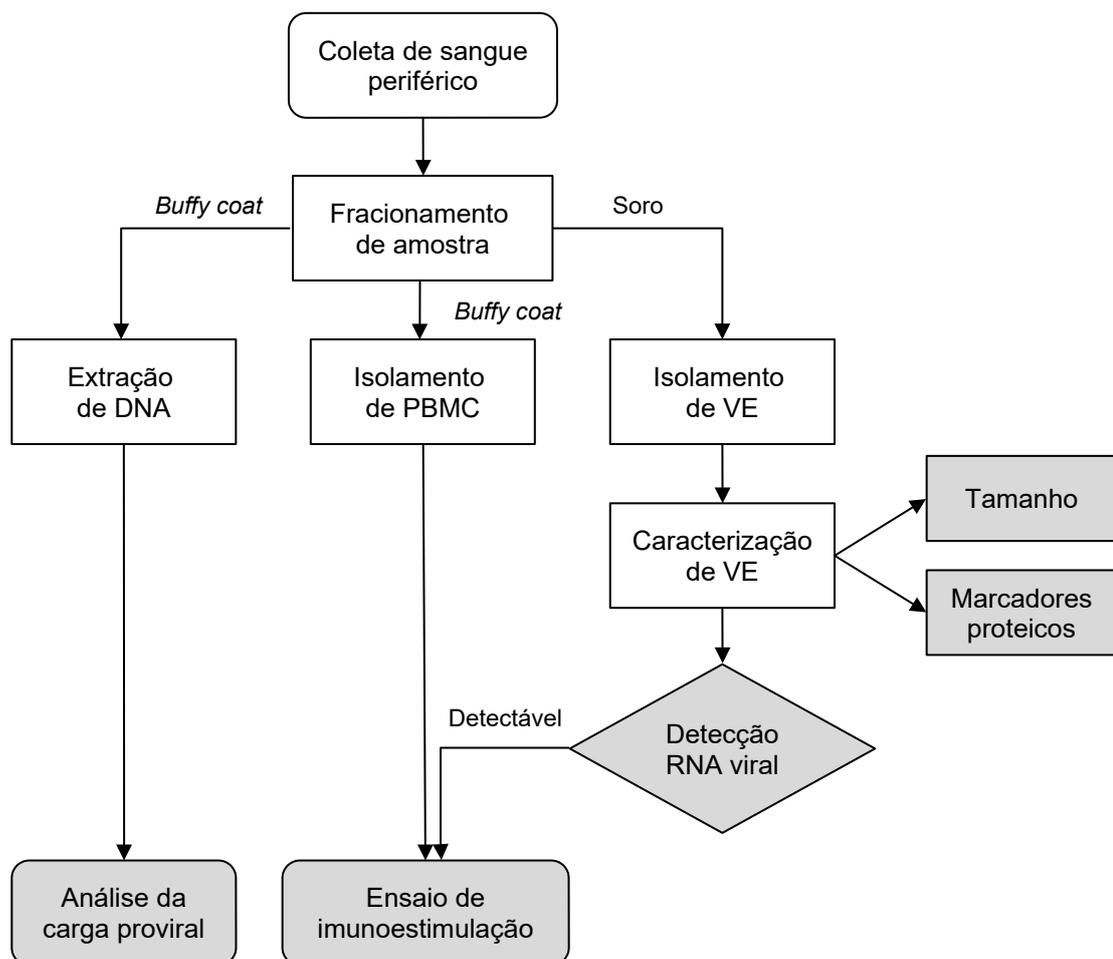
2.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar a CPV do HTLV-1 em PBMC de indivíduos HTLV-1 positivos;
- b) Isolar e caracterizar VE provenientes do soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e de controles saudáveis;
- c) Quantificar a expressão dos genes virais tax e HBZ em VE isoladas do soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1;
- d) Observar o efeito imunomodulador das VE isoladas do soro de pacientes HTLV-1 positivos em PBMC de indivíduos saudáveis.

3 Material e Métodos

A estratégia experimental deste trabalho está representada na figura 7.

Figura 7 – Fluxograma da estratégia experimental.



Fonte: Própria.

3.1 Casuística

A coorte deste estudo é composta por um total de 26 indivíduos, distribuídos em 13 indivíduos saudáveis e 13 indivíduos infectados. Os indivíduos infectados foram classificados como assintomáticos (*HTLV-1 asymptomatic carrier*, HAC) ou

sintomáticos para a HAM/TSP de acordo com os critérios do Ministério da Saúde (CASTRO-COSTA et al., 2005). A infecção foi diagnosticada previamente pela detecção do DNA proviral do HTLV-1 no sangue periférico e o diagnóstico clínico foi confirmado por neurologista especializado em neuroinfecologia (Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - HCFMRP/USP).

3.1.1 Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP/USP)

Foram coletadas amostras de sangue periférico de 13 portadores do HTLV-1, sendo seis pertencentes ao grupo HAC e sete ao grupo HAM/TSP. A punção venosa foi realizada por profissionais da área de enfermagem da instituição, sob coordenação do Prof. Dr. Osvaldo Massaiti Takayanagui (Ambulatório de Neurologia Tropical do HCFMRP-USP). Os dados clínicos foram coletados nos prontuários ao longo de 1 a 2 anos de acompanhamento dos pacientes.

Como critérios de inclusão, foram considerados indivíduos com maioridade civil (maior ou igual a 18 anos de idade) e diagnóstico de infecção por HTLV-1. Como critérios de exclusão, indivíduos com idade menor a 18 anos, homens e mulheres com deficiência intelectual, mulheres grávidas, pacientes em uso de imunossupressores ou insuficiência renal ou hepática, neoplasias ou doenças autoimunes e diagnóstico de infecção para outros agentes infecciosos (HIV, HBV e HCV).

3.1.2 Hemocentro de Ribeirão Preto

Para compor o grupo controle do estudo, 13 amostras de sangue periférico foram coletadas de candidatos a doadores de sangue pareados por sexo e idade com os indivíduos portadores do HTLV-1. A punção venosa foi realizada por profissionais da área de enfermagem vinculados à instituição. A coleta de sangue foi realizada durante a doação, e foi utilizado o primeiro jato de sangue retido na

bactbag (bolsa que retém possíveis fragmentos de pele e sujidades durante a doação).

Como critérios de inclusão, foram considerados indivíduos com maioridade civil (maior ou igual a 18 anos de idade) com sexo e idade iguais a dos indivíduos infectados participantes do estudo (± 2 anos). Os critérios de exclusão adotados foram os mesmos utilizados para triagem clínica e epidemiológica de candidatos a doação de sangue, de acordo com a RDC 399/2020 (BRASIL, 2020) e são listados como: comportamento sexual de risco, uso de drogas injetáveis, etilismo, diagnóstico de neoplasias ou diagnóstico de infecção para agentes infecciosos (HIV, HTLV, Hepatite C, Sífilis, doença de Chagas e malária).

3.2 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HC-FMRP/USP (Processo HCRP: 9179/2019) (Apêndice I). Todos os participantes foram instruídos quanto à coleta e armazenamento de amostra biológica e quanto à aplicação e os objetivos do estudo. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi aplicado a todos os participantes envolvidos (Apêndice II).

3.3 Fracionamento de amostras

Foram coletados 13,5 mL de sangue periférico em três tubos contendo anticoagulante citrato de sódio para obtenção do plasma e PBMC dos participantes. Primeiramente, as amostras foram centrifugadas a 1.500 x g durante 10 minutos para coleta do plasma. Este foi coletado, aliquoteado e estocado em freezer a -80 °C. Em seguida, a camada de leucócitos de um dos tubos foi utilizada para a etapa de extração de DNA, descrita no item 3.4. Os demais tubos citrato foram utilizados para isolamento e armazenamento de PBMC, descrito no item 3.10.2.

Paralelamente foram coletados 15 mL de sangue periférico em tubos contendo ativador de coágulo e gel separador para obtenção do soro dos

participantes. As amostras foram incubadas durante 30 minutos em temperatura ambiente para que coagulassem, sendo em seguida centrifugadas a 1.500 x *g* durante 10 minutos. O soro obtido foi coletado, aliquotado e armazenado em freezer a -80 °C até a etapa de isolamento de vesículas extracelulares.

3.4 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada a partir das células contidas na camada de leucócitos utilizando o kit Gentra Puregene Blood (Qiagen). Foram adicionados 9 mL de tampão de lise de glóbulos vermelhos (NH₄Cl a 144 mM e NH₄HCO₃ a 1mM) à camada de leucócitos, seguido de incubação em temperatura ambiente durante 15 minutos, sob constante agitação. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 1.500 x *g* por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado por inversão. Uma nova etapa de lise de glóbulos vermelhos foi realizada.

O precipitado de células obtido (leucócitos) foi submetido a homogeneização vigorosa seguida de adição de 3 mL da solução de lise de células (QIAGEN) e 15 µL da enzima RNase. A amostra foi homogeneizada e incubada em banho maria a 37 °C durante 15 minutos, a fim de garantir a obtenção de DNA livre de RNA. Em seguida, foi adicionado 1 mL de solução de precipitação de proteínas (QIAGEN) e a amostra foi novamente homogeneizada e centrifugada (2.000 x *g* durante 10 minutos). O sobrenadante obtido foi transferido para novo tubo contendo 3 mL de isopropanol e homogeneizado por inversão. O tubo foi centrifugado a 2.000 x *g* durante 3 minutos para obtenção do precipitado de material genético. Foi realizada uma etapa de lavagem com 3 mL de etanol 70% e o precipitado obtido foi incubado em temperatura ambiente para secar.

Após a completa evaporação do etanol, o DNA purificado foi reconstituído em água livre de nucleases, quantificado em espectrofotômetro e armazenado em freezer -20 °C até a etapa de uso.

3.5 Detecção do DNA proviral

O DNA extraído (250 ng) foi amplificado na técnica de *nested* PCR para os genes virais *tax* e LTR, a fim de confirmar a presença ou ausência do provírus do HTLV-1 em PBMC dos participantes do estudo.

Para a primeira reação, foram utilizados 0,25 pmol de cada iniciador externo, 0,1 mM de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), 0,02 mM de cloreto de magnésio e uma unidade da enzima *Taq* / DNA polimerase (Life Technologies), em volume final de 25 µL. A ciclagem foi realizada em termociclador GeneAmp® PCR system 9700 (Applied Biosystems), com temperaturas de desnaturação das moléculas de DNA presentes (95 °C), anelamento dos iniciadores (temperatura de acordo com cada par de iniciador, indicada na Tabela 1) e extensão de novas fitas de DNA (72 °C).

Para a segunda reação foram aplicadas as mesmas condições, substituindo apenas os iniciadores externos pelos internos acrescidos de 2,5 µL do produto da primeira reação. A sequência dos iniciadores internos e externos está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequências de iniciadores *sense* e *antisense* para os genes *tax* e LTR do HTLV-1.

Gene	Posição	Fita	Sequência (5' - 3')	Temperatura anelamento
<i>tax</i>	Externo	<i>Sense</i>	TCG AAA CAG CCC TGC AGA TA	55 °C
		<i>Antisense</i>	TGA GCT TAT GAT TTG TCT TCA	55 °C
	Interno	<i>Sense</i>	ATA CAA AGT TAA CCA TGC TT	55 °C
		<i>Antisense</i>	AGA CGT CAG AGC CTT AGT CT	55 °C
LTR	Externo	<i>Sense</i>	CAC CCA TTT CCT CCC CAT G	60 °C
		<i>Antisense</i>	GGT CAG GCA AAG CGT GGA	60 °C
	Interno	<i>Sense</i>	CGT TGA CGA CAA CCC CTC A	64 °C
		<i>Antisense</i>	AAG GCC CGG TCT CGA CC	64 °C

Fonte: Própria.

Por fim, o produto da segunda reação foi corado com o intercalante de DNA *GelRed* (Sigma-Aldrich), submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e iluminado à luz ultravioleta para a visualização das bandas correspondentes e identificação das amostras infectadas. Amostras que apresentaram fragmento de 253 pares de base (pb) para a reação de LTR e/ou fragmento de 1.050 pb para a reação de *tax* foram consideradas positivas para HTLV-1.

3.6 Quantificação absoluta da carga proviral

A reação de PCR quantitativa *multiplex* foi empregada para obtenção da quantificação absoluta do número de cópias do provírus presente no material genético de 10^5 PBMC. Para isto, foi utilizado o sistema TaqMan, que conta com iniciadores e sondas de hidrólise específicos para os genes de interesse (o gene viral *pol* e o gene endógeno da β -globina humana).

A partir do vetor plasmidial previamente construído em nosso laboratório, foi determinada a curva padrão do número de cópias dos genes *pol* e β -globina humana (SALUSTIANO, 2016). Para isto, foram realizadas diluições seriadas de 10^{10} cópias até uma única cópia do plasmídeo em água livre de nucleases. A partir da curva padrão, pelo cálculo de equação da reta, tornou-se possível inferir o número de cópias de cada amostra amplificada. O número de cópias foi calculado com base na massa (g) e concentração (ng/ μ L) da construção molecular. A massa da construção molecular foi calculada conforme indicado na equação:

$$massa = (\text{tamanho do plasmídeo em pb}) \times 1,096 \times 10^{-21}$$

Para a reação com volume final de 25 μ L foram utilizados: 10,5 μ L do reagente comercial *GoTaq Probe qPCR Master Mix* (Promega), 2,5 μ L dos iniciadores *sense* e *antisense* para a região *pol* a 5 μ M, 1,25 μ L dos iniciadores *sense* e *antisense* para o gene da β -globina humana a 5 μ M, 1 μ L de cada sonda gene-específica a 5 μ M e 500 ng de DNA, correspondentes ao material genético de 10^5 células. A sequência dos iniciadores e sondas utilizados para esta reação está descrita na tabela 2. A reação foi realizada no equipamento *7500 Real-Time PCR*

Systems (Applied Biosystems), com incubações de 50 °C durante 2 minutos, 95 °C durante 10 minutos e 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

Tabela 2 – Sequências de sondas e iniciadores *sense* e *antisense* para a região *pol* e para o gene da β -globina humana.

Gene	Fita	Sequência (5' - 3')
<i>pol</i>	<i>Sense</i>	CAG CCC CTT CAC AGT CTC TAC TG
	<i>Antisense</i>	AGA AGG ATT TAA ATA TAT TTG GTC TCG G
	Sonda	FAM-CCT TAC AAA GGC ATA CTG AT-MGB
β -globina	<i>Sense</i>	TGA AGG CTC ATG GCA AGA AA
	<i>Antisense</i>	GGT GAG CCA GGC CAT CAC
	Sonda	NED-TGC TCG GTG CCT TT-MGB

Fonte: Própria.

Para a quantificação absoluta do número de cópias de cada gene, foi realizada a interpolação dos valores de Ct obtidos nas amostras de indivíduos infectados com os valores obtidos na curva padrão. Para isto, utilizou-se a equação da reta ($y = ax + b$), onde y corresponde ao valor de Ct e x corresponde ao número de cópias. A eficiência de amplificação da reação foi calculada pela seguinte equação, onde E corresponde à eficiência da reação e o *slope* corresponde à inclinação da reta:

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

Por fim, a CPV a cada 10^5 PBMC foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\left[\frac{(\text{número de cópias de } pol)}{(\text{número de cópias de } \beta\text{-globina})} \right] \times 2 \times 10^5$$

3.7 Isolamento de vesículas extracelulares

As VE foram isoladas pelos métodos de ultracentrifugação e precipitação polimérica, conforme descritos a seguir, a fim de comparar o efeito das VE isoladas por diferentes métodos em PBMC.

3.7.1 Isolamento de VE por ultracentrifugação

As VE foram purificadas do plasma por centrifugação diferencial seguida de ultracentrifugação, conforme descrito anteriormente (THÉRY et al., 2006). Inicialmente, o plasma obtido foi diluído na proporção 1:1 em tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS) e centrifugado a 2.000 x g durante 10 minutos, para remoção de células mortas. Em seguida, o sobrenadante foi centrifugado a 10.000 x g durante 30 minutos para remoção de corpos apoptóticos. Por fim, o sobrenadante foi centrifugado a 100.000 x g durante 70 minutos para a precipitação de VE. O precipitado resultante foi ressuscitado com PBS em 1/10 do volume inicial de plasma e armazenado à 4 °C até as próximas etapas de processamento. Todas as centrifugações desta etapa foram realizadas a 4 °C.

3.7.2 Isolamento de VE por precipitação polimérica

A população de VE enriquecidas em exossomos do soro foi isolada pela técnica de precipitação polimérica, utilizando o reagente comercial *Exoquick Exosome Precipitation Solution* (System Biosciences) - um polímero que auxilia na precipitação de partículas de 30 a 200 nm de diâmetro. Para o isolamento, foram seguidas as recomendações do fabricante. Em síntese, o soro foi previamente centrifugado a 3.000 x g durante 15 minutos para a remoção de corpos apoptóticos. Ao sobrenadante foi adicionado o polímero Exoquick (1/4 do volume de soro), seguido de incubação a 4 °C durante uma hora. Em seguida, foram realizadas duas etapas de centrifugação (1.500 x g durante 30 minutos e posteriormente, 1.500 x g durante 5 minutos) para obtenção do precipitado de VE. O precipitado foi ressuscitado em PBS e armazenado em freezer -80 °C para as análises seguintes.

3.8 Caracterização de VE

As vesículas extracelulares isoladas por ultracentrifugação ou precipitação polimérica foram caracterizadas quanto ao tamanho e a presença de marcadores

proteicos comuns às VE, pelas técnicas de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e *Western blot*, respectivamente.

3.8.1 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A avaliação da concentração e do diâmetro das partículas isoladas foi realizada por NTA, utilizando o equipamento *Malvern NanoSight NS300* (Malvern Panalytical). Para a análise, as amostras foram diluídas previamente em PBS nas proporções de 1:1.000 a 1:5.000. Foram capturados três vídeos de 15 segundos por amostra com os seguintes parâmetros: câmera sCMOS, laser verde, shutter 1300, ganho 512 e *threshold* de detecção 8. Os dados de concentração e tamanho das partículas foram obtidos a partir da média das concentrações e tamanho observados em cada um dos vídeos. A análise foi realizada com auxílio do *software NanoSight NTA v3.2*.

3.8.2 Análise de marcadores proteicos

De acordo com as recomendações da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (em inglês, *International Society for Extracellular Vesicles*, ISEV) (THÉRY et al., 2018), foram avaliadas a presença de duas proteínas comuns às VE, sendo estas: a proteína citosólica Alix e a transmembrana CD9. Além destas, a proteína p19 foi investigada como controle específico à partícula viral do HTLV-1.

3.8.2.1 Extração de proteínas

As proteínas foram extraídas a partir das VE isoladas nos itens 3.5.1. e 3.5.2., utilizando 100 µL do tampão de extração de proteínas RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% desoxicolato de sódio, 0,1% SDS, Sigma-Aldrich) suplementado com 1% de inibidores de protease e fosfatase (Sigma-Aldrich). Após a adição do tampão, foram realizados três ciclos de sonicação (5 minutos) e incubação em banho de gelo (5 minutos), seguidos de etapa de centrifugação a 18.000 x g

durante 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi coletado e armazenado em freezer -80 °C até a etapa de quantificação.

3.8.2.2 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o kit *Quick Start Bradford protein assay* (Bio-Rad), que utiliza o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* e uma solução proteica padrão para a detecção e quantificação de proteínas totais. A solução padrão é composta por albumina sérica bovina (BSA) a 2 mg/mL, diluída em quatro concentrações (0,5 mg/mL, 1 mg/mL, 1,5 mg/mL e 2 mg/mL) para construção da curva padrão. A concentração de cada amostra analisada foi obtida após a leitura de absorbância a 595 nm seguida de interpolação dos valores de leitura obtidos nas amostras com os valores obtidos na curva padrão.

3.8.2.3 SDS-PAGE

Para a análise de *immunoblotting*, as proteínas foram dissociadas e migradas por eletroforese em gel gradiente de poliacrilamida Tris-Glicina SDS 4-20%. Para isto, 30 µg do extrato proteico foi preparado com 7,5 µL de tampão NuPAGE® LDS (Life Technologies) acrescido de 20% de β-mercaptoetanol (v/v). As amostras foram incubadas em banho seco a 95 °C durante 10 minutos, sendo em seguida submetidas a eletroforese a 20 V durante 30 minutos e a 60 V até a saída do azul de bromofenol do gel.

3.8.2.4 Western Blot

As proteínas migradas foram transferidas a 35 V durante 1h10 para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) previamente ativada em metanol. Em seguida, foi realizado o bloqueio da membrana com 10% de leite desnatado (w/v) e 0,1% de Tween 20 (v/v) em solução salina tamponada com Tris (*Tris-Buffered Saline*, TBS). Após o bloqueio, a membrana foi incubada com os anticorpos

primários a 4 °C *overnight*, sob agitação constante. No dia seguinte, foram realizadas 4 lavagens de 5 minutos com 0,1% Tween (v/v) em TBS, seguidas de incubação com anticorpos secundários apropriados, conjugados com a enzima peroxidase, durante uma hora e meia, em temperatura ambiente.

Para a visualização dos complexos antígeno-anticorpo formados, foi utilizado o kit *ECL™ Prime Western Blotting System* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. O sinal quimioluminescente foi registrado no fotodocumentador *ChemiDoc XRS+ System* (Bio-Rad).

3.9 Avaliação da expressão de genes virais em EV

Foi avaliada a expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nas VE isoladas do soro dos participantes do estudo conforme descrito a seguir.

3.9.1 Extração de RNA de EV

A extração de RNA foi realizada utilizando o reagente comercial *TRIzol* (ThermoFisher Scientific) seguido do sistema *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen), de acordo com a metodologia apresentada por Salustiano (2016). As VE isoladas foram lisadas por homogeneização vigorosa com o reagente *TRIzol* (1/2 do volume de soro usado para o isolamento de VE), seguida de adição de clorofórmio (1/5 do volume de *TRIzol*). A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada em temperatura ambiente durante 10 minutos.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x *g* durante 15 minutos a 4 °C e a fase aquosa obtida foi transferida para novo tubo (separação de fases). A cada 200 µL de fase aquosa obtidos foi adicionado 1 µL de poliacrilamida linear como coprecipitante (*GenElute LPA*, Sigma-Aldrich) e 200 µL de isopropanol. As amostras foram incubadas durante 16 horas (*overnight*) em freezer -20 °C.

Após o período de incubação, as amostras foram carregadas na coluna fornecida pelo kit *QIAamp Viral RNA*. Foram realizadas duas etapas de lavagem com os tampões *AW1* e *AW2*, de acordo com as instruções fornecidas pelo kit. O RNA foi reconstituído em 40 µL de água livre de nucleases acrescida de 0.04% de

azida de sódio (tampão AVE) e quantificado por espectrofotometria, utilizando o equipamento Nanodrop 2000c (Thermofisher Scientific). Por fim, o RNA extraído foi armazenado a -80 °C até as próximas etapas de processamento.

3.9.2 Reação da transcriptase reversa

O RNA extraído (200 ng) foi transcrito em DNA complementar (cDNA) utilizando o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Thermofisher Scientific) e iniciadores específicos para os genes a serem analisados (Tabela 3). O mix de reagentes foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi incubada em termociclador a 25 °C durante 10 minutos para o anelamento dos iniciadores, a 37 °C durante duas horas para a síntese do DNA complementar e a 85 °C durante 5 minutos para a inativação da enzima. O cDNA sintetizado foi armazenado em freezer a -20 °C.

Tabela 3 – Sequência de iniciadores *antisense* para os genes virais *tax* e HBZ e para o gene endógeno da β -actina.

Gene	Fita	Sequência (5' - 3')
β -actina	<i>Antisense</i>	CCA GGG CAG TGA TCT CCT TCT
<i>tax</i>	<i>Antisense</i>	GAG AAA CTT ACC CAT GGT GTT GG
HBZ	<i>Antisense</i>	GAG CCG ATA ACG CGT CCA T

Fonte: Própria.

3.9.3 PCR quantitativa

A quantificação dos genes de interesse foi realizada pela técnica de PCR em tempo real a partir do cDNA sintetizado anteriormente. Para isto, foi empregada uma reação *singleplex* para cada gene analisado.

3.9.3.1 Detecção do gene endógeno da β -actina

Para a reação de β -actina foram utilizados 12,5 μ L do reagente comercial *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1,25 μ L do reagente comercial *TaqMan Human ACTB (Beta Actin) Endogenous Control* (Hs99999903_m1), 6,25 μ L de água livre de nucleases e 5 μ L de cDNA. O reagente

comercial para detecção do gene endógeno é composto por uma sonda marcada com o *reporter dye* VIC e o *quencher* TAMRA, além de dois iniciadores não-marcados. A reação de amplificação foi realizada na plataforma *ABI 7500 sequence detection* (Applied Biosystems).

3.9.3.2 Detecção dos genes virais *tax* e *HBZ*

Para as reações de *tax* e *HBZ* foram utilizados 12,5 µL do reagente comercial *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0,75 µL dos iniciadores *sense* e *antisense* a 10 µM, 0,75 µL de sonda gene-específica a 5 µM, 5,25 µL de água livre de nucleases e 5 µL de cDNA. As sequências dos iniciadores e sondas utilizados estão descritas na tabela 4. A reação de amplificação foi realizada na plataforma *ABI 7500 sequence detection* (Applied Biosystems).

Tabela 4 – Sequências de iniciadores e sondas específicos para os genes virais *tax* e *HBZ*.

Gene		Sequência (5' - 3')
<i>tax</i>	<i>Sense</i>	ATC CCG TGG AGA CTC CTC AA
	<i>Antisense</i>	GAG AAA CTT ACC CAT GGT GTT GG
	Sonda	FAM-AGC TGC ATG CCC AAG A-MGB
<i>HBZ</i>	<i>Sense</i>	TAC ATC GTC ACG CCC TAC TGG
	<i>Antisense</i>	GAG CCG ATA ACG CGT CCA T
	Sonda	FAM-ATC AGA TCA CCT GGG ACC-MGB

Fonte: Própria.

Os resultados da expressão gênica de *tax* e *HBZ* obtidos foram expressos em Unidades Relativas de Expressão (URE) (ALBESIANO et al., 2003), conforme o cálculo descrito:

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

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

3.10 Ensaios de imunoestimulação

O potencial imunomodulatório das VE obtidas foi avaliado quanto à capacidade de induzir a liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias em PBMC saudáveis e HTLV-1 positivo pelo ensaio de imunoestimulação.

3.10.1 Preparo de soro fetal bovino depletado de exossomos

O soro fetal bovino depletado de VE foi produzido a partir do soro fetal bovino comercial (Gibco), centrifugado a 100.000 x g durante 18 horas a 4 °C. O sobrenadante obtido foi considerado livre de VE e utilizado no cultivo de PBMC (SCHWARTZ, 2019).

3.10.2 Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

As PBMC foram isoladas pelo método de gradiente de densidade, utilizando o reagente comercial *Ficoll Hypaque PLUS* (GE Healthcare) - um polímero de sacarose. Em ambiente estéril, o sangue coletado com anticoagulante foi diluído na proporção 1:1 em PBS e vertido cuidadosamente sobre 1 volume do polímero, em tubo falcon. O tubo foi centrifugado a 930 x g durante 40 minutos a 22 °C para formação do gradiente de densidade de células. As células presentes entre a porção de plasma e polímero foram coletadas e lavadas duas vezes com 50 mL de PBS. O precipitado de células foi obtido após centrifugação a 300 x g durante 10 minutos. As células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco), contadas em câmara de Neubauer e reservadas para o ensaio de imunoestimulação ou para criopreservação em soro fetal bovino inativado (Gibco) acrescido de 10% de DMSO (v/v).

3.10.3 Ensaio de imunoestimulação das PBMC por VE

Um total de 100.000 PBMC foram cultivadas em placas de 24 poços em 500 µL de RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 1% de Penicilina-Estreptomicina a 10.000 U/mL (Gibco) e 10% de soro fetal bovino depletado de exossomos (ver item

3.8.1.), e expostas às VE infectadas durante 48 e 72 horas. A preparação de VE foi normalizada pela quantidade total de proteínas obtidas no extrato. Foram testadas as concentrações de 100, 500, 1.000 e 2.000 µg/mL.

Seis horas antes da coleta de células foi adicionada a combinação de 50 ng/mL de *phorbol-12-myristate-13-acetate* (PMA, Sigma-Aldrich) and 1 µg/mL ionomicina (Fluka) ao poço a ser utilizado como controle positivo, a fim de estimular a liberação de citocinas inflamatórias. Ao controle negativo foi adicionado volume de PBS ou do polímero para precipitação polimérica (Exoquick) igual ao volume de vesículas adicionado aos poços de teste.

3.10.4 Análise da expressão de citocinas inflamatórias

Após a coleta das PBMC, as células foram submetidas à técnica de extração de RNA por meio do kit *comercial RNeasy Mini Kit* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. As células rompidas com 350 µL de tampão RLT e acrescidas de etanol a 70%. Em seguida, o volume gerado foi carregado na coluna fornecida pelo kit e três etapas de lavagem foram realizadas com os tampões RW1 e RPE. Por fim, o RNA obtido foi reconstituído em água livre de nucleases e quantificado por espectrofotometria, utilizando o equipamento Nanodrop 2000c (ThermoFisher Scientific). O RNA extraído foi armazenado em freezer a -80 °C.

O cDNA foi sintetizado a partir do RNA obtido conforme o protocolo descrito no item 3.7.2., utilizando iniciadores randômicos. Para as análises de expressão gênica das citocinas inflamatórias foi utilizada a metodologia TaqMan, conforme descrito no item 3.7.3.1, utilizando sondas específicas para os genes interferon-gama (Hs00989291_m1), interleucina 4 (IL-4) (Hs00174122_m1) e interleucina 8 (IL-8) (Hs00174103_m1). A normalização da reação foi feita pelo gene endógeno da β -actina (Hs99999903_m1), e os níveis de expressão foram calculados pelo método de delta-delta Ct.

3.10.5 Quantificação de citocinas

Foi avaliado o perfil de citocinas e quimiocinas inflamatórias liberadas pelas PBMC em co-cultivo com VE infectadas. Para determinar a quantidade das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10 e da quimiocina CXCL10/IP-10 em picogramas por mililitro (pg/mL) no sobrenadante de cultura, foi empregada a plataforma *multiplex* customizada *MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel* (Millipore, cat. no. HCYTOMAG-60K). A aquisição de dados foi realizada pelo equipamento *Luminex MAGPIX System - EMD Millipore*, e os dados adquiridos foram analisados por meio do *software Milliplex Analyst v3.5* (Millipore). O procedimento de detecção foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

3.11 Análises estatísticas

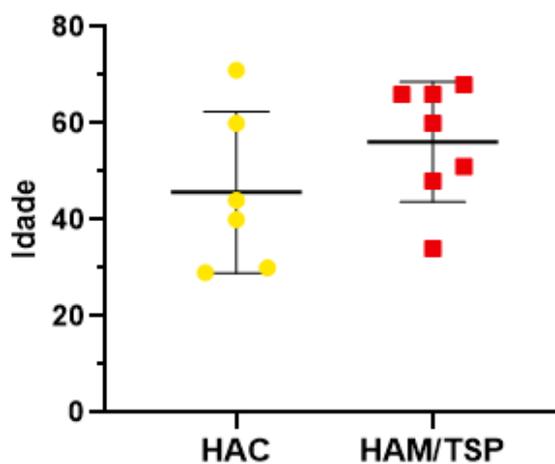
Os dados coletados foram inseridos em planilhas Microsoft Office Excel, onde foram realizadas as análises descritivas de média e desvio padrão. Para a confecção de gráficos e análises inferenciais, foi utilizado o *software* GraphPad Prism, versão 8.0.2. Os dados de idade foram avaliados quanto à distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e quanto à diferença entre as médias apresentadas pelos grupos sintomático e assintomático (teste T student). A diferença entre e as CPV apresentadas pelos participantes sintomáticos e assintomáticos foi investigada pelo teste de Mann-Whitney e a correlação entre a idade e a CPV de cada indivíduo foi avaliada pelo teste de Spearman, assim como a correlação entre a CPV e os níveis de transcritos virais observados em VE. A distribuição do tamanho e da concentração das VE foi comparada entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis e entre amostras pareadas, pelo teste de Mann-Whitney. Por fim, a resposta ao tratamento com VE observado em PBMC foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós teste de Dunn. Para todas as análises, o p-valor bilateral $\leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 Resultados

4.1 Caracterização dos portadores do HTLV-1

Foram coletadas 26 amostras de sangue periférico para compor os grupos de estudo deste projeto. Destas, seis amostras pertencentes ao grupo de portadores assintomáticos (HAC), sete amostras de portadores sintomáticos (HAM/TSP) e 13 amostras de indivíduos saudáveis, doadores de sangue, pertencentes ao grupo controle (CTRL). A idade dos indivíduos HAC variou de 29 a 71 anos, com média de 46 anos (± 17 anos), enquanto que os indivíduos HAM/TSP apresentaram de 34 a 68 anos, com média de 56 anos (± 12 anos). A idade dos indivíduos CTRL foi pareada à dos indivíduos infectados. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p = 0,2230$, teste T) (Figura 8). Foi observado que 69,2% (9/13) pertence ao gênero feminino e 76,9% (10/13) tem idade superior a 40 anos (Tabela 5).

Figura 8 – Representação gráfica da distribuição de idades dos portadores do HTLV-1.



HAC: Portador assintomático do HTLV-1; **HAM/TSP:** Portador da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1. Fonte: Própria.

Tabela 5 – Distribuição dos portadores do HTLV-1 quanto ao sexo e a idade.

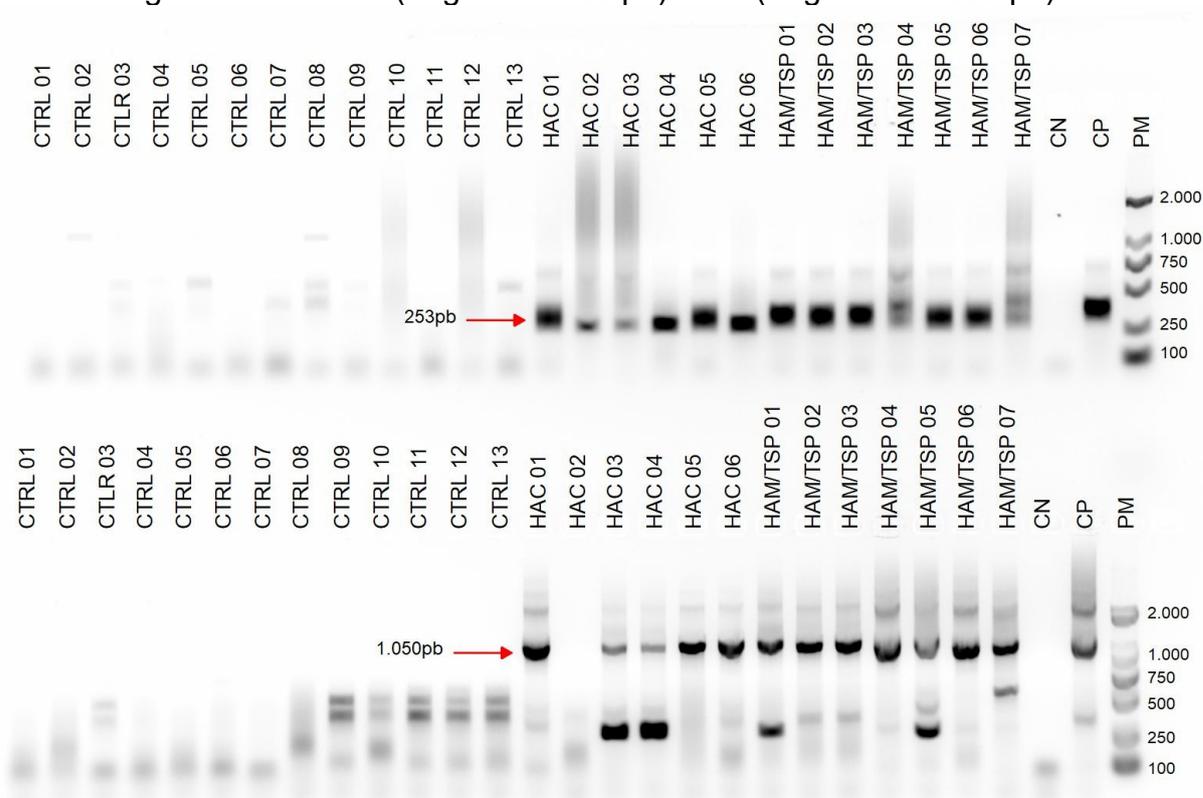
Gênero	Grupo HAC		Grupo HAM/TSP	
	n	%	n	%
Feminino	4	30,8%	5	38,5%
Masculino	2	15,4%	2	15,4%
Total	13 (100%)			
Idade				
< 40	2	15,4%	1	7,7%
≥ 40	4	30,8%	6	46,2%
Total	13 (100%)			

HAC: Portador assintomático do HTLV-1; **HAM/TSP:** Portador da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1. Fonte: Própria.

4.2 Detecção do DNA proviral do HTLV-1

Nenhum dos doadores de sangue apresentaram o provírus do HTLV-1 em PBMC, sendo portanto considerados aptos para compor o grupo controle do estudo (Figura 9). Ademais, a presença do DNA proviral do HTLV-1 foi confirmada em todos os indivíduos previamente diagnosticados, sendo distribuídos entre os grupos HAC e HAM/TSP (Figura 9).

Figura 9 – Fotodocumentação de eletroforese em gel de agarose a 1,5% das amostras de DNA dos participantes do estudo, investigadas quanto à presença dos genes virais LTR (fragmento 253 pb) e tax (fragmento 1.050 pb).

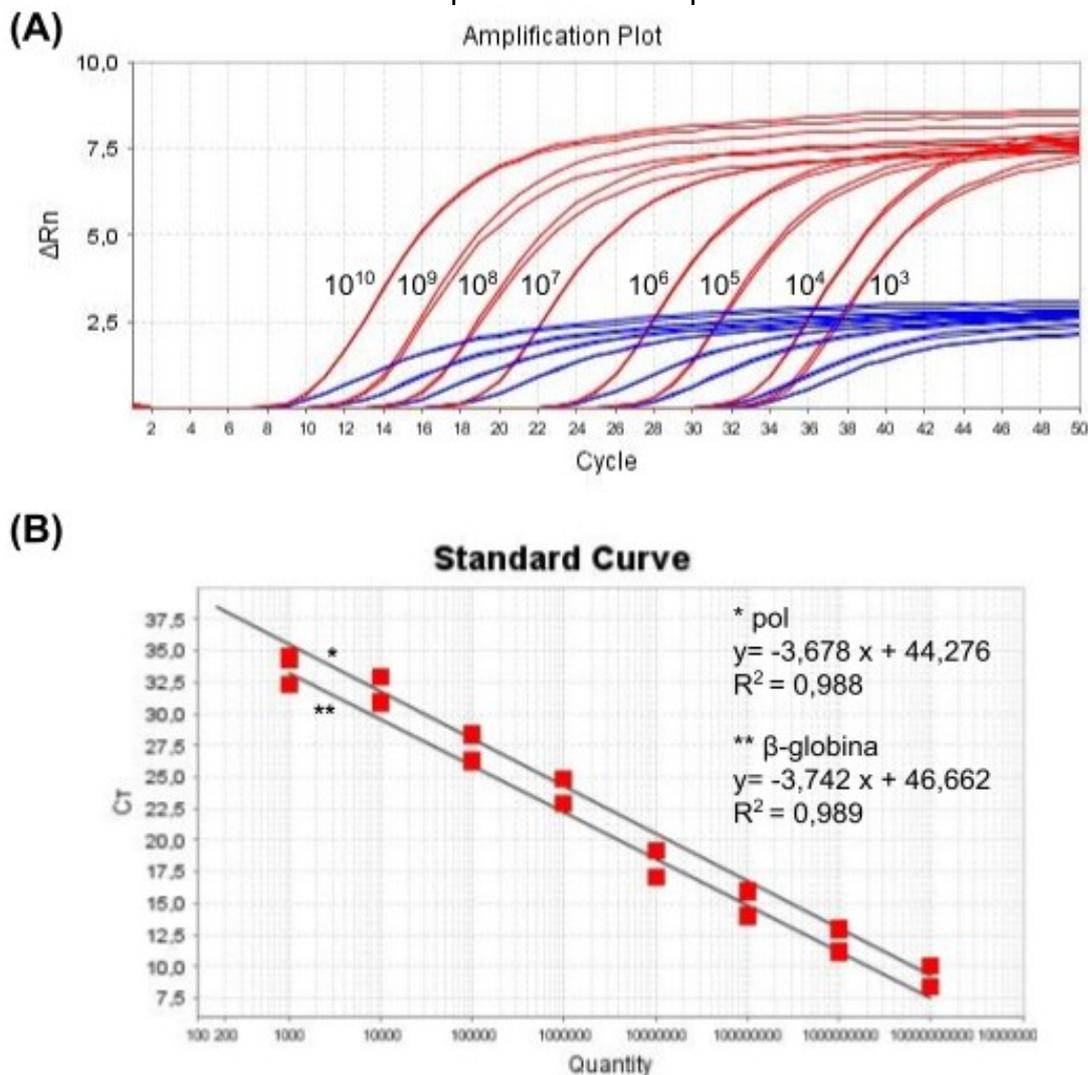


CN: Controle negativo; **CP:** Controle positivo; **PM:** Peso molecular. Fonte: Própria.

4.3 Análise da carga proviral

A curva padrão empregada no cálculo da CPV está representada na Figura 10 e foi construída a partir dos valores de amplificação obtidos após diluição do DNA plasmidial de 10^{10} a 10^3 cópias. As retas de regressão linear para os genes pol e β -globina humana apresentaram coeficiente de correlação (R^2) de 0,988 e 0,989, respectivamente, e eficiência de 85 a 87%.

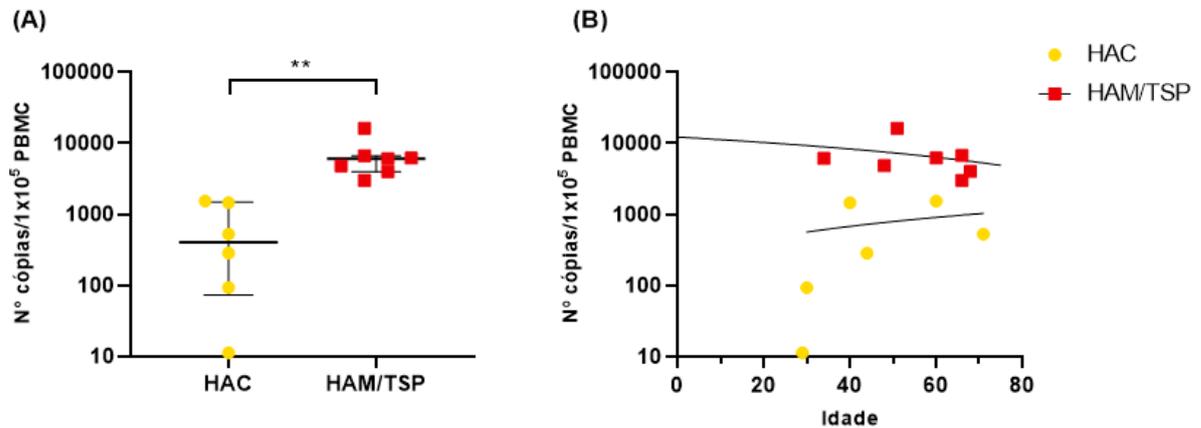
Figura 10 – Representação gráfica das curvas de amplificação e curvas padrão utilizadas para quantificação do número de cópias dos genes *pol* e β -globina humana por PCR em tempo real.



(A) Curva de amplificação das diluições em série (10^{10} a 10^3) do DNA plasmidial contendo fragmentos dos genes *pol* e β -globina humana. O eixo y representa a intensidade de fluorescência (ΔRn) e o eixo x representa o número de ciclos da reação. **(B)** Curvas padrão construídas pelo valor de Ct (eixo y) e o número de cópias de DNA plasmidial (eixo x). R^2 : Coeficiente de determinação; * Curva padrão do gene *pol*; ** Curva padrão do gene da β -globina humana. Fonte: Própria.

Os indivíduos do grupo HAM/TSP apresentaram aumento significativo do número de cópias do provírus a cada 10^5 PBMC quando comparados aos indivíduos do grupo HAC ($p = 0,0025$, Mann-Whitney) (Figura 11A). Por outro lado, o aumento do número de cópias do provírus não apresentou correlação com a idade dos indivíduos que compuseram os grupos HAC e HAM/TSP. (Spearman r HAC = 0,7143; Spearman r HAM/TSP = -0,3063) (Figura 11B).

Figura 11 – Representação gráfica da distribuição da carga proviral de portadores do HTLV-1.



(A) Relação entre a CPV e o grupo de estudo. **(B)** Correlação entre a CPV e a idade do indivíduo infectado. A CPV está expressa em número de cópias do provírus a cada 10^5 PBMC. **CPV:** carga proviral; **HAC:** portador assintomático do HTLV-1; **HAM/TSP:** Portador da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1. Mann-Whitney: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Fonte: Própria.

A CPV média observada em indivíduos do grupo HAC foi de 652,7 cópias/ 10^5 PBMC, enquanto os indivíduos do grupo HAM/TSP apresentaram em média 6.727,5 cópias/ 10^5 PBMC. Dentre os HAM/TSP observou-se oscilação da CPV entre valores próximos a 3.000 e 7.000 cópias/ 10^5 PBMC, com exceção do indivíduo HAM/TSP 01, que apresentou 16.244,9 cópias/ 10^5 PBMC. Este indivíduo também foi o único a não apresentar quadro clínico de paraparesia (Tabela 6).

Tabela 6 – Características clínicas e carga proviral dos portadores do HTLV-1.

Paciente	Gênero	Idade	CPV	Disfunção vésico-intestinal	Dor lombar	Espasticidade	Parestesia	Fraqueza em MMII	Paraparesia
HAC 1	M	44	285,3	Não	Não	Não	Não	Não	Não
HAC 2	F	71	527,6	Não	Não	Não	Não	Não	Não
HAC 3	F	40	1.457,3	Não	Não	Não	Não	Não	Não
HAC 4	F	30	93,4	Não	Não	Não	Não	Não	Não
HAC 5	M	60	1.541,5	Não	Não	Não	Não	Não	Não
HAC 6	F	29	11,3	Não	Não	Não	Não	Não	Não
HAM/TSP 1	F	51	16.244,9	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Não
HAM/TSP 2	F	66	6.708,2	Sim	Não	Não	Sim	Sim	Sim
HAM/TSP 3	F	68	4.007,8	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim
HAM/TSP 4	F	34	6.097,1	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
HAM/TSP 5	M	48	4.830,1	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
HAM/TSP 6	F	66	2.997,1	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
HAM/TSP 7	M	60	6.207,1	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Sim

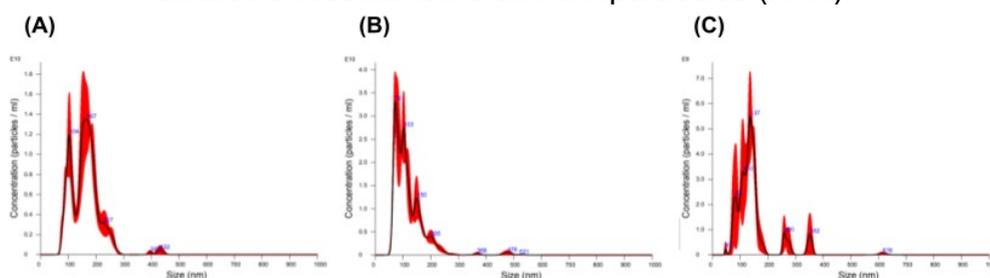
A CPV está expressa em número de cópias do provírus a cada 10^5 PBMC. **CPV**: Carga proviral; **HAC**: Portador assintomático do HTLV-1; **HAM/TSP**: Portador da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1; **MMII**: membros inferiores. Fonte: Própria.

4.4 Caracterização das VE

4.4.1 Tamanho e concentração

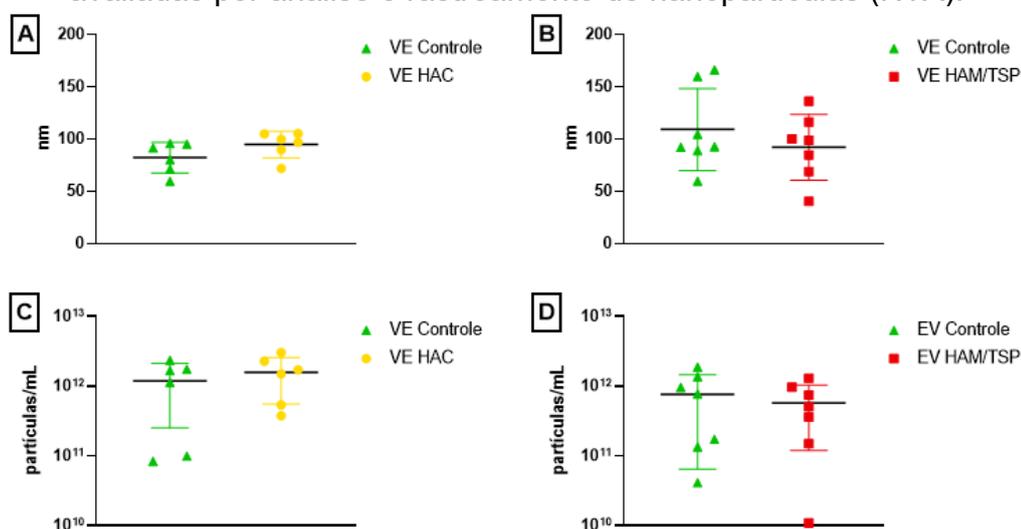
As concentrações médias de VE isoladas pela técnica de precipitação polimérica dos grupos HAC, HAM/TSP e CTRL foram de $1,57 \times 10^{12}$ partículas/mL, $5,74 \times 10^{11}$ partículas/mL e $9,51 \times 10^{11}$ partículas/mL, respectivamente. As partículas isoladas apresentaram tamanho modal de 71,9 a 105,3 nm (grupo HAC), 40,4 a 136,3 nm (grupo HAM/TSP) e 59,6 a 166,2 nm (grupo CTRL), característicos da fração exosomal de VE (Figura 12). Não houve diferença significativa entre o diâmetro e a concentração de partículas dos grupos analisados (Figura 13).

Figura 12 – Tamanho e concentração das partículas isoladas do soro avaliadas por análise e rastreamento de nanopartículas (NTA).



Os gráficos apresentam a distribuição do tamanho das partículas, em nm, pela concentração, em partículas/mL. (A) CTRL 7, (B) HAC 5, (C) HAM 5. Fonte: Própria.

Figura 13 – Distribuição do tamanho e concentração das partículas isoladas do soro avaliadas por análise e rastreamento de nanopartículas (NTA).



HAC: Portador assintomático do HTLV-1; **HAM/TSP:** Portador da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1; **VE:** Vesículas extracelulares. O teste de Kruskal-Wallis foi

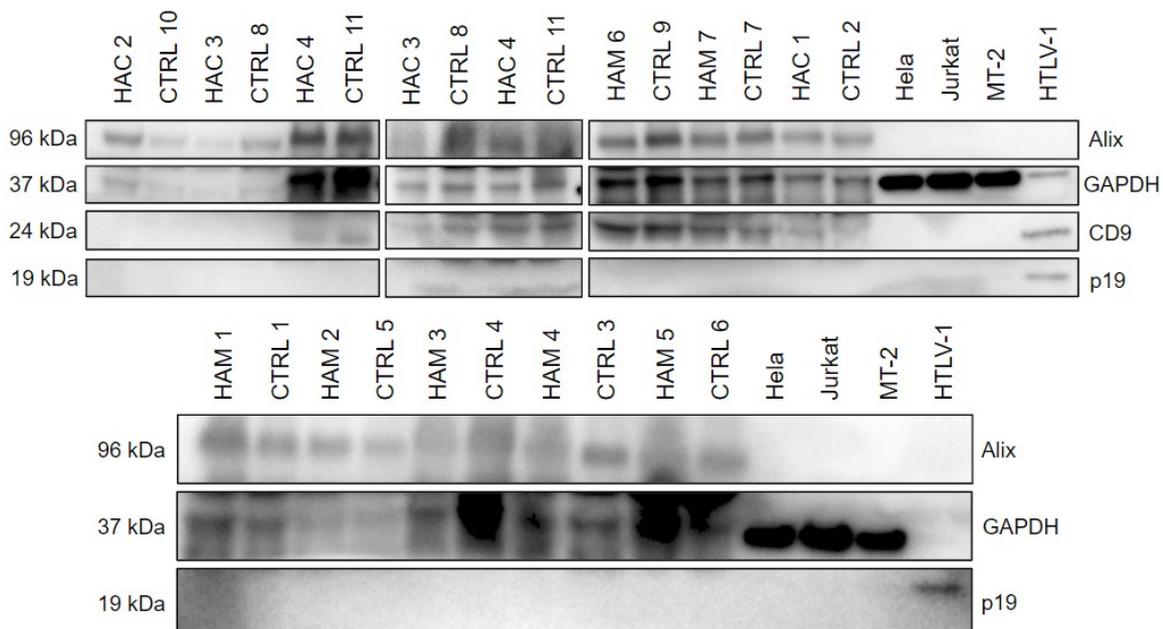
aplicado para a comparação entre os grupos HAC, HAM/TSP e CTRL, e o teste de Mann-Whitney para comparação entre amostras pareadas. Fonte: Própria.

4.4.2 Marcadores proteicos

Para a caracterização das VE isoladas por precipitação polimérica, investigamos algumas das proteínas comumente encontradas em VE: a proteína citosólica Alix, a transmembrana CD9 e a enzima GAPDH. Adicionalmente, investigamos a proteína p19 pertencente ao capsídeo viral, como controle específico ao vírion do HTLV-1.

Conforme apresentado na figura 14, foi possível observar a presença das proteínas Alix, CD9 e GAPDH. Os níveis proteicos observados nos grupos HAC, HAM/TSP e CTRL, comparados a células epiteliais (Hela), linfócitos saudáveis (Jurkat) e linfócitos infectados (MT-2) indicam que tais proteínas encontram-se enriquecidas em VE. A proteína viral p19 não pôde ser detectada, o que indica a ausência de partículas virais no extrato de VE.

Figura 14 – Avaliação da presença de marcadores proteicos comuns às VE por *Western blot*.

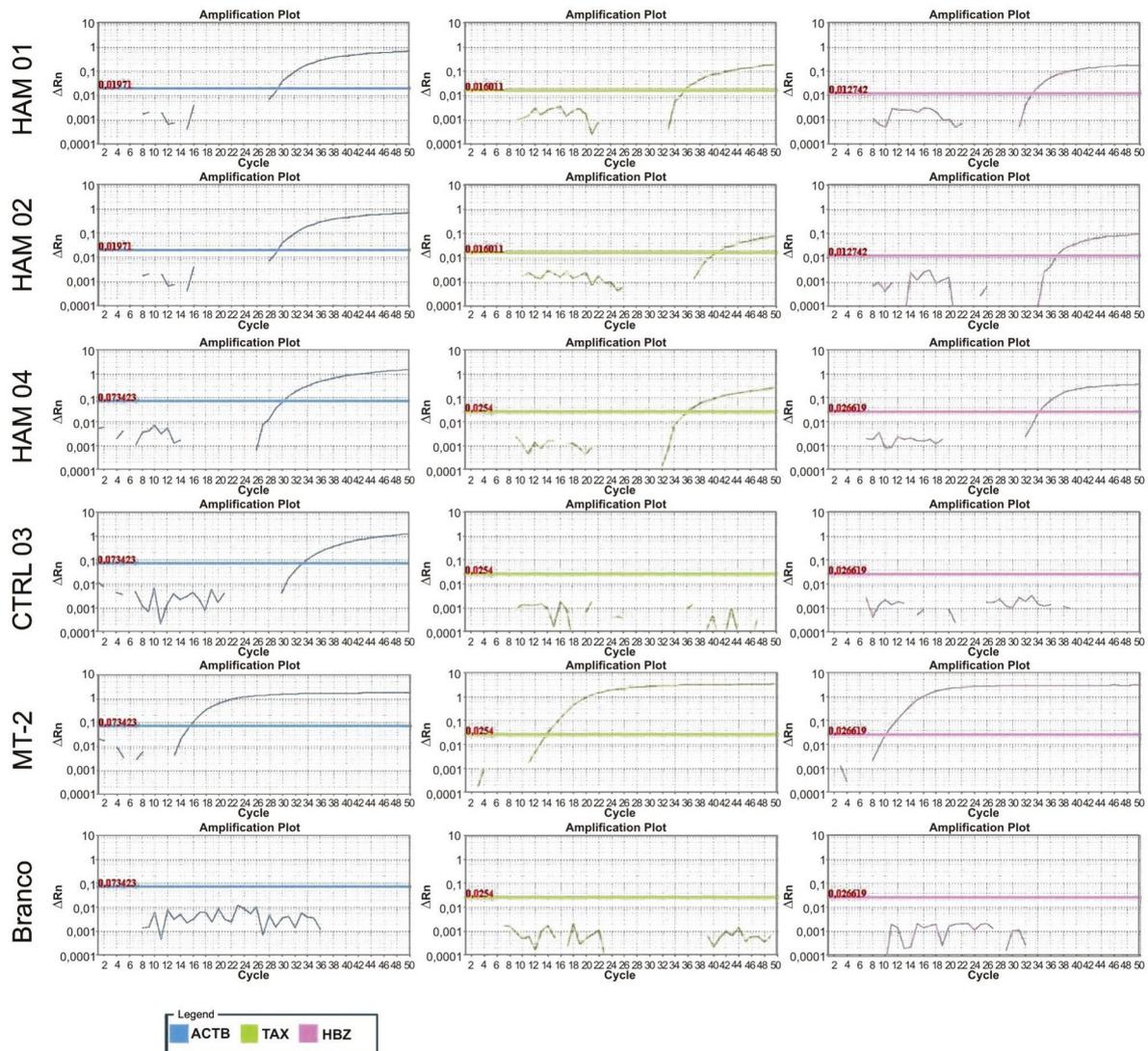


O tamanho das bandas está indicado em kilodaltons (kDa) à esquerda. **CTRL**: Grupo não infectado; **HAC**: Portador assintomático do HTLV-1; **HAM/TSP**: Portador da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1; **Hela**: Linhagem celular de câncer cervical; **Jurkat**: Linhagem celular de linfócitos T; **MT-2**: Linhagem celular de linfócitos infectados pelo HTLV-1. **HTLV-1**: vírion do HTLV-1. Fonte: Própria.

4.5 Quantificação relativa de tax e HBZ em VE

A quantificação dos genes virais tax e HBZ em VE isoladas do soro foi realizada em todos os 26 participantes do estudo. Conforme apresentado na Figura 15, apenas três indivíduos pertencentes ao grupo HAM/TSP apresentaram níveis detectáveis dos genes tax e HBZ em VE (Figura 15). Dentre estes, o indivíduo com maior CPV apresentou também expressão elevada dos genes tax e HBZ em VE isoladas do soro quando comparada à expressão observada nos demais indivíduos (Tabela 7). A relação entre a CPV observada no indivíduo e os níveis de transcritos virais em VE circulantes foi avaliada pelo teste de Spearman, que indicou correlação positiva entre as duas variáveis (Spearman r tax = 0,8078; Spearman r HBZ = 0,8078) (Figura 16). Ademais, observou-se também uma quantidade elevada de transcritos de HBZ quando comparados aos transcritos de tax, onde os níveis de HBZ mostraram-se ser de duas a dez vezes maiores que tax (Tabela 7).

Figura 15 – Representação gráfica dos perfis de amplificação dos genes β -actina, tax e HBZ em VE isoladas do soro e na linhagem celular MT-2.



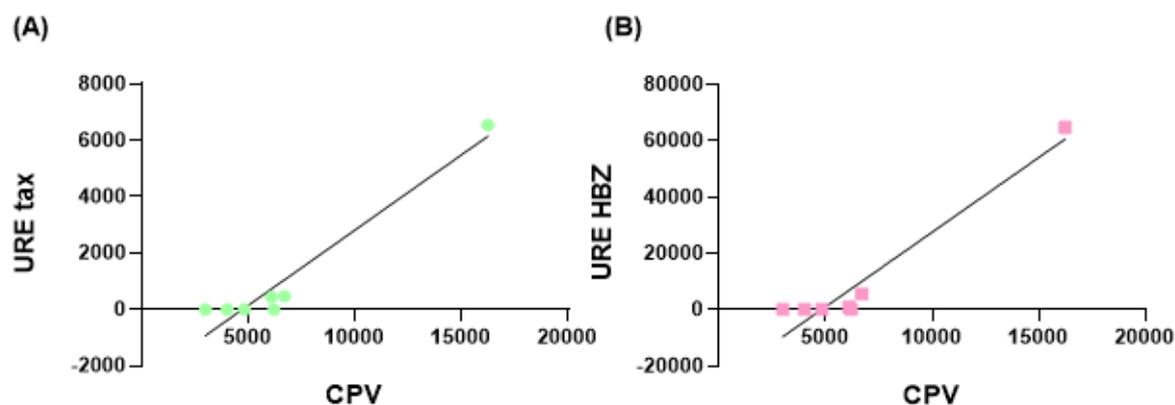
CTRL: Grupo não infectado; **HAC:** Portador assintomático do HTLV-1; **HAM/TSP:** Portador da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1; **HBZ:** *HTLV-1 basic leucine zipper-factor*; **MT-2:** Linhagem celular de linfócitos infectados pelo HTLV-1; **tax:** Proteína transativadora do HTLV-1. Fonte: Própria.

Tabela 7 – Níveis de expressão dos genes tax e HBZ em VE isoladas do soro comparados à CPV de portadores do HTLV-1.

Paciente	URE tax	URE HBZ	CPV	URE HBZ/ URE tax
HAC 1	0	0	285,31	0
HAC 2	0	0	527,64	0
HAC 3	0	0	1.457,31	0
HAC 4	0	0	93,4	0
HAC 5	0	0	1.541,48	0
HAC 6	0	0	11,31	0
HAM 1	6.548,94	64.725,48	16.244,89	9,88
HAM 2	473,44	5.545,29	6.708,24	11,71
HAM 3	0	0	4.007,81	0
HAM 4	435,54	995,14	6.097,13	2,28
HAM 5	0	0	4.830,14	0
HAM 6	0	0	2.997,14	0
HAM 7	0	0	6.207,12	0

A CPV está expressa em número de cópias do provírus a cada 10^5 PBMC. **CPV**: Carga proviral; **HAC**: Portador assintomático do HTLV-1; **HAM/TSP**: Portador da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1; **HBZ**: *HTLV-1 basic leucine zipper-factor*; **mRNA**: RNA mensageiro; **tax**: Proteína transativadora do HTLV-1; **URE**: Unidades relativas de expressão. Fonte: Própria.

Figura 16 – Correlação entre a carga proviral e a expressão dos genes tax e HBZ em VE de portadores do HTLV-1.



CPV: Carga proviral; **HBZ**: *HTLV-1 basic leucine zipper-factor*; **tax**: Proteína transativadora do HTLV-1; **URE**: Unidades relativas de expressão. Fonte: Própria.

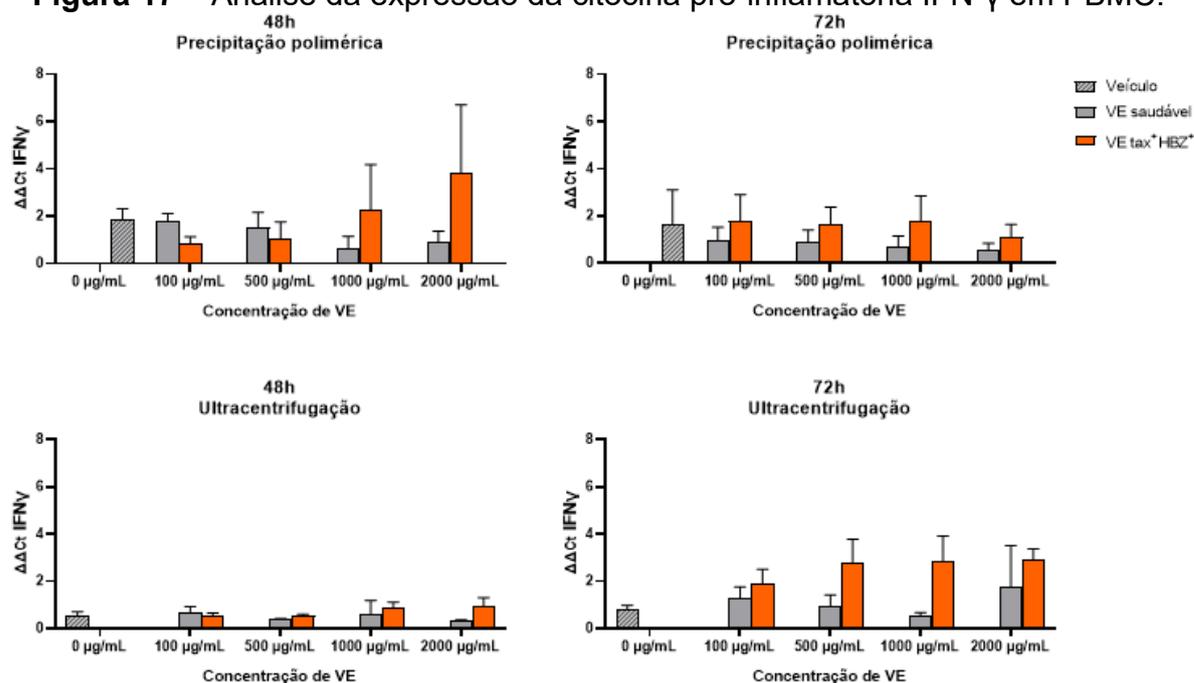
4.6 Ensaios de imunoestimulação

A fim de avaliar o potencial imunomodulatório de VE tax⁺ HBZ⁺, PBMC saudáveis (*naive*) e PBMC portadoras do HTLV-1 foram expostas a crescentes concentrações de VE (100, 500, 1.000 e 2.000 µg/mL). A resposta ao cocultivo foi avaliada quanto à síntese de novos transcritos e secreção de citocinas inflamatórias comumente alteradas em indivíduos sintomáticos para o HTLV-1.

Inicialmente, para estabelecer a condição ideal de cocultivo, PBMC *naive* foram expostas a VE isoladas por precipitação polimérica ou ultracentrifugação, durante 48 e 72 horas. Foram utilizadas as VE isoladas do paciente HAM/TSP 1 e de seu respectivo controle pareado (CTRL 1). O paciente HAM/TSP 1 foi escolhido para esta etapa pois apresentou maior CPV e maior concentração de transcritos em VE quando comparado aos demais indivíduos HAM/TSP.

Nesta etapa, o potencial imunomodulatório das VE foi avaliado pela expressão gênica da citocina pró-inflamatória IFN- γ , esta foi a citocina encontrada alterada em cocultivos de VE e PBMC de trabalhos anteriores de nosso grupo (OTAGUIRI et al., 2018). Após 48h, observou-se um aumento dose-dependente de transcritos de IFN- γ em PBMC cocultivadas com VE tax e HBZ positivas isoladas por precipitação polimérica, ainda que sem significado estatístico (teste Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn) (Figura 17). Esta condição foi utilizada nos experimentos consecutivos.

Figura 17 – Análise da expressão da citocina pró-inflamatória IFN- γ em PBMC.



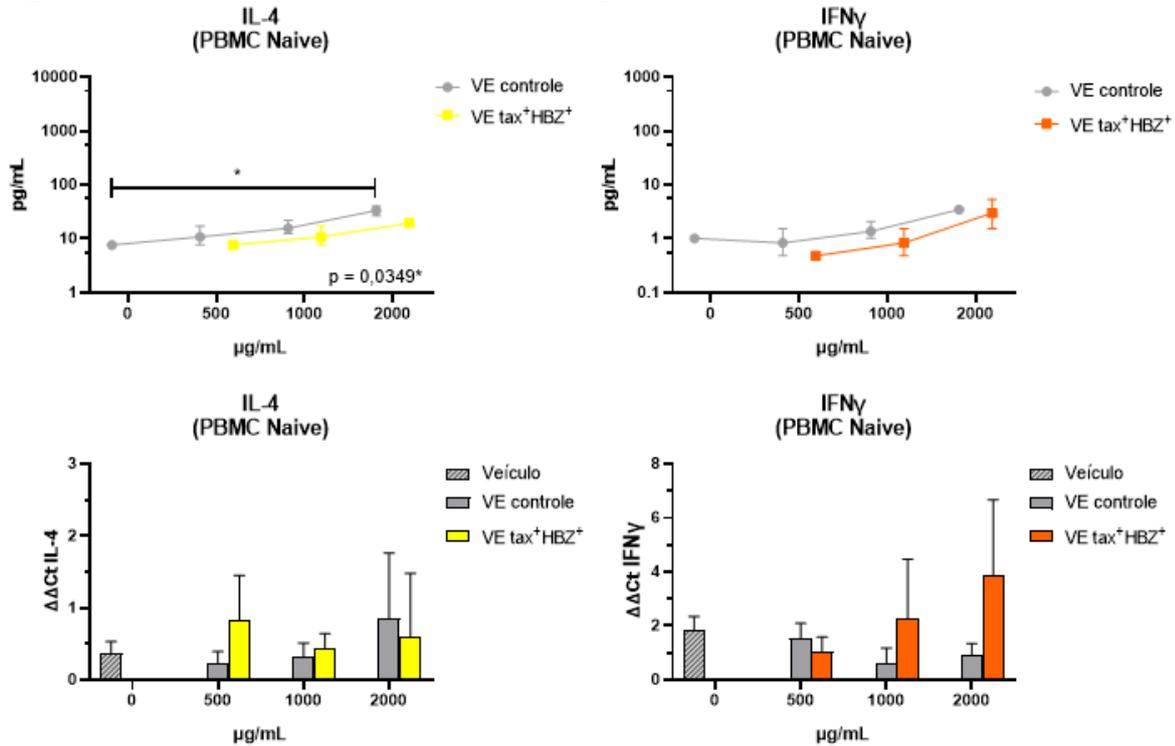
Os experimentos foram realizados em triplicata biológica. **VE**: Vesículas extracelulares; **Veículo**: PBMC cultivadas exclusivamente com o polímero utilizado para a precipitação de VE. Fonte: Própria.

Após 48 horas de cocultivo de PBMC *naive* e PBMC infectadas com VE, foi avaliado o potencial imunomodulatório das VE tax⁺ HBZ⁺ pela liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias no sobrenadante de cultura. Para este experimento, foram utilizadas as VE dos indivíduos HAM 1 e CTRL 1, PBMC saudáveis e PBMC dos pacientes HAC 6 (CPV = 11,3 cópias/10⁵ PBMC) e HAC 7 (CPV = 5.806,3 cópias/10⁵ PBMC).

Foram quantificadas as citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8 e IL-10 e a quimiocina CXCL10/IP-10 (Apêndice I). Dentre as citocinas analisadas, observou-se aumento significativo na secreção da citocina IL-4 após o tratamento de PBMC *naive* com 2.000 $\mu g/mL$ de VE saudáveis ($p = 0,0349$, Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn) (Figura 18). Houve também aumento da citocina IFN- γ , refletindo o que foi observado a nível transcricional, ainda que sem significado estatístico (Figura 18). Além disso, observou-se um aumento dose-dependente da secreção e transcrição da citocina IL-8 em PBMC do paciente HAC 6, quando tratadas com VE tax⁺ HBZ⁺. Interessantemente, após o tratamento com 2.000 $\mu g/mL$ de VE tax⁺ HBZ⁺, os níveis

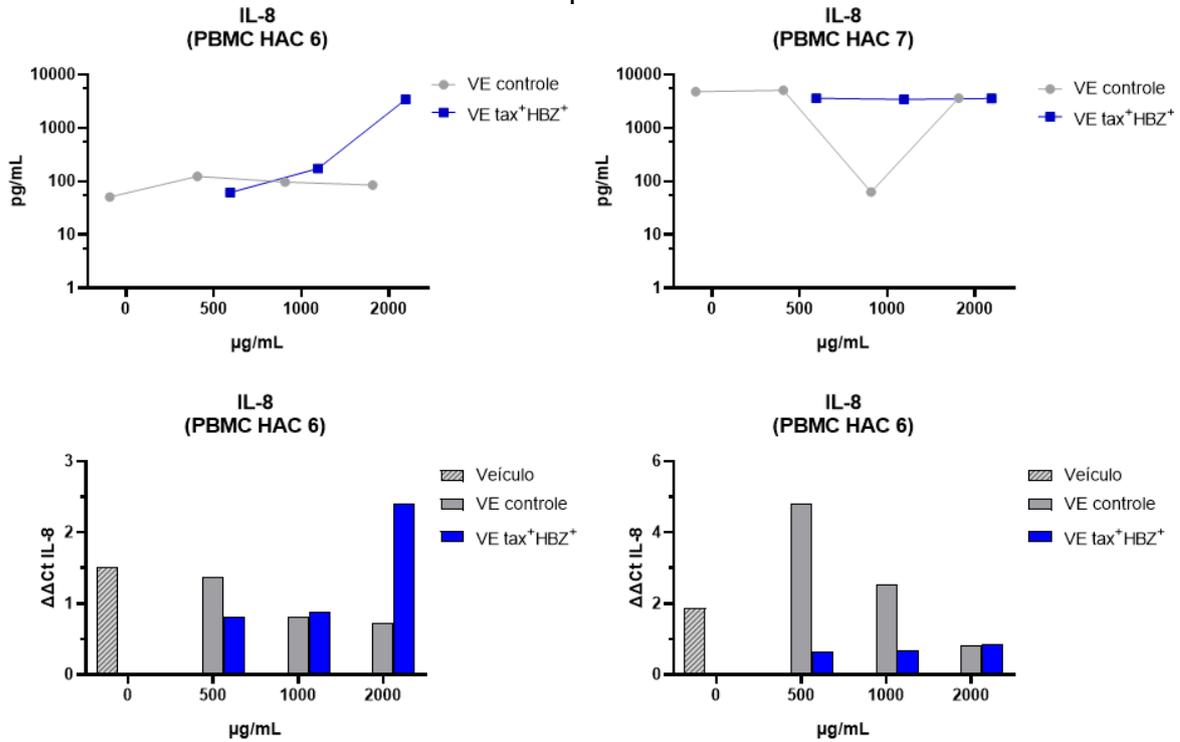
de IL-8 ficaram próximos ao observado em um indivíduo com CPV elevada, sugerindo aumento da inflamação mediado por VE (Figura 19).

Figura 18 – Análise da expressão e secreção de citocinas inflamatórias em PBMC.



Os experimentos foram realizados em triplicata biológica. VE: Vesículas extracelulares. **Veículo:** PBMC cultivadas exclusivamente com o polímero utilizado para a precipitação de VE. Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Fonte: Própria.

Figura 19 – Análise da expressão e secreção da citocina inflamatória IL-8 em PBMC infectadas pelo HTLV-1.



Os experimentos foram realizados em unicata. **HAC**: PBMC de portador assintomático do HTLV-1; **VE**: Vesículas extracelulares; **Veículo**: PBMC cultivadas exclusivamente com o polímero utilizado para a precipitação de VE. Fonte: Própria.

5 Discussão

Este trabalho avaliou três aspectos relacionados a VE circulantes e portadores do HTLV-1: i) avaliação do conteúdo de VE do soro de portadores do HTLV-1, especificamente de transcritos de tax e HBZ em VE; ii) correlação entre o conteúdo das VE e o perfil clínico dos pacientes (estadiamento da doença e carga proviral); e iii) avaliação do potencial imunomodulatório de VE tax+ HBZ+ em PBMC pela quantificação de novos transcritos e citocinas envolvidos na resposta inflamatória. Acreditamos que o estudo funcional de VE na infecção pelo HTLV-1 pode contribuir para a compreensão da fisiopatogenia de doenças associadas, como a HAM/TSP.

Na literatura, observa-se que a infecção pelo HTLV-1 tende a aumentar significativamente em mulheres acima de 40 anos (SILVA et al., 2018). Os dados demográficos dos participantes de nosso estudo corroboram a literatura descrita. Estas observações são comumente discutidas como consequência da transmissão horizontal da infecção, mais provável de ocorrer do homem para a mulher (KAJIYAMA et al., 1986; COSTA et al., 2013). A prevalência em pessoas acima de 40 anos pode estar relacionada ao processo de soroconversão tardia, ao risco cumulativo de novas infecções ao longo da vida e/ou ao aumento da exposição a parceiros sexuais (SILVA et al., 2018).

Os portadores da HAM/TSP apresentaram CPV média 10 vezes maior que indivíduos assintomáticos (HAC), independentemente da idade. Este achado também é observado em outros estudos sobre o HTLV-1 e pode refletir o estado da infecção no organismo de cada paciente (NAGAI et al., 1998; ORLAND et al., 2003; OLINDO et al., 2005; IWANAGA et al., 2010; FURTADO et al., 2012). A avaliação da CPV em indivíduos infectados é comumente sugerida para o monitoramento da infecção (OLINDO et al., 2005). A exemplo disso, neste trabalho foi identificado um portador da HAM/TSP sem o quadro clínico completo de paraparesia. Este indivíduo apresentou CPV três vezes maior que os demais HAM/TSP. Sabe-se que os pacientes sintomáticos para a HAM/TSP apresentam CPV elevada no início dos

sintomas, que tende a diminuir ou permanecer estável após a manifestação da doença (MARTINS et al., 2017). Portanto, a elevada CPV pode ser justificada pelo estágio inicial dos sintomas em que o paciente se encontra.

A CPV foi correlacionada aos níveis de transcritos virais em VE circulantes de portadores do HTLV-1. Para tanto, os ensaios para o monitoramento das VE circulantes partiram do soro dos infectados. A utilização do soro garante informações sobre o estado clínico do paciente, com uma coleta minimamente invasiva. Além disso, preparações de VE a partir do soro contém menor quantidade de RNAs de origem não-vesicular quando comparadas à preparações feitas do plasma (CHIAM et al., 2020), o que garantiu maior especificidade às análises subsequentes deste estudo.

Sabe-se que o perfil de RNA de cada população de VE é diferente. A população exosomal (de aproximadamente 40 a 100 nm de diâmetro) é abundante em RNAs pequenos e livres de RNA ribossomal (CRESCITELLI et al., 2013). Desta forma, utilizamos a técnica de precipitação polimérica pois favorece o isolamento de VE enriquecidas em exossomos. A técnica de precipitação polimérica permite a concentração de um grande número de VE de até 200 nm de diâmetro, partindo de um pequeno volume de soro em um tempo reduzido, quando comparada ao método de ultracentrifugação (PRENDERGAST et al., 2018; THÉRY et al., 2018). Além disto, a precipitação polimérica permite o isolamento de VE de forma delicada, sem alterar a morfologia da partícula para o formato “*cup-shaped*” comumente observado em VE isoladas por ultracentrifugação (LEE; PARK; KANG, 2016). Adicionalmente, o método apresenta dois principais contrapontos: a coprecipitação de lipoproteínas, proteínas e RNAs de origem não-exosomal e a contaminação da amostra com o polímero utilizado para o enriquecimento de VE (TAYLOR; SHAH, 2015). Para minimizar tais interferências, foi realizado isolamento de VE do soro, além de um cocultivo controle, com apenas o polímero utilizado para a precipitação de VE (veículo).

Não foi possível observar diferença significativa entre o tamanho e o rendimento de VE isoladas de indivíduos infectados e de indivíduos controle. É importante ressaltar que existem diversos fatores que podem influenciar a morfologia das VE, tais como: idade, sexo, gravidez, dieta e índice de massa corporal (THÉRY

et al., 2018). Neste estudo, estes interferentes foram minimizados pelo pareamento por sexo e idade entre os indivíduos infectados e não-infectados. Entretanto, como a metodologia escolhida isola partículas de um tamanho específico, a comparação entre VE isoladas por métodos alternativos pode revelar novas características de VE em portadores do HTLV-1.

Além do tamanho, as VE foram caracterizadas quanto a presença de marcadores proteicos característicos e a ausência da proteína viral p19. Esta estratégia foi utilizada devido à similaridade entre a biogênese de partículas virais e VE. Desta forma, foi possível a otimização do isolamento de VE, aumentando a especificidade dos resultados de cocultivo apresentados neste trabalho. Este foi o primeiro trabalho a isolar VE do soro de portadores do HTLV-1 e garantir a ausência de partículas virais no preparo.

Uma vez caracterizadas, as VE foram submetidas ao processo de extração de RNA por uma combinação de técnicas: separação de fases (Trizol) seguida de purificação em coluna (QIAamp Viral RNA Mini Kit). Conforme Prendergast e cols. (2018), esta estratégia apresenta maior reprodutibilidade quanto à qualidade e rendimento do RNA obtido de VE quando comparada à precipitação de RNA convencional ou à adsorção em coluna. Neste trabalho, destacamos que esta metodologia foi adaptada para detecção de material viral.

Observou-se que os transcritos de HBZ são cerca de 2 a 10 vezes mais expressos que os transcritos de tax em VE de portadores do HTLV-1. Ademais, os níveis de transcritos de ambos os genes foram positivamente correlacionados à CPV dos indivíduos HAM/TSP. Saito e cols. (2009) demonstraram que os níveis de transcritos de HBZ também são maiores que os de tax em PBMC de portadores do HTLV-1. Contudo, no referido trabalho, apenas os transcritos de HBZ foram positivamente correlacionados à CPV dos indivíduos HAM/TSP. Os transcritos de tax mostram-se correlacionados apenas à CPV de assintomáticos para o HTLV-1. Estas observações sugerem que a presença de transcritos virais em VE reflete a expressão observada nas células que as originam.

A detecção de material viral do HTLV-1 em VE de linhagens infectadas (JAWORSKI et al., 2014; OTAGUIRI et al., 2018; PINTO et al., 2019) e de PMBC expandidas *in vitro* (ANDERSON et al., 2018) já foram descritas anteriormente.

Entretanto, este trabalho demonstra pela primeira vez a detecção *in vivo* dos genes *tax* e *HBZ* em VE provenientes diretamente de portadores do HTLV-1, correlacionada à CPV. Os genes *tax* e *HBZ* são amplamente associados ao desenvolvimento de sintomas. A presença de transcritos desses genes em VE indica que as células infectadas podem utilizar a via de comunicação das VE para disseminar conteúdo viral, perpetuando a inflamação crônica observada em pacientes com a HAM/TSP em desenvolvimento.

Para investigar esta hipótese, realizamos o cocultivo de VE *tax*+ *HBZ*+ com células do sistema imunológico ativadas (PBMC de portadores assintomáticos) e não-ativadas (PBMC *naive*). O tempo de exposição necessário para o *uptake* de VE em PBMC foi baseado em estudos anteriores. Feng e cols. (2010) estabeleceram que linfócitos imortalizados iniciam o processo de absorção de VE após 15 minutos de cocultivo, atingindo o platô após 12 horas. Outros estudos envolvendo o cocultivo de VE com células imunológicas estabeleceram o período de 48 a 72 horas para a dosagem de citocinas inflamatórias, considerando o tempo necessário para a absorção de VE, o processamento de mRNAs e a ativação das vias de sinalização de citocinas (OTAGUIRI et al., 2018; PENG; ZHANG; ZHOU, 2019). Portanto, este estudo observou o efeito de VE em PBMC *naive* após 48 e 72 horas. A priori, o efeito das VE foi avaliado por análise de expressão gênica da citocina inflamatória IFN- γ . Conforme demonstrado por Otaguiri e cols. (2018), o cocultivo de PBMC *naive* com VE de células infectadas pelo HTLV-1 causa uma polarização dos linfócitos para a resposta imune do tipo Th1 (antiviral), sinalizada pela expressão desta citocina.

Outro aspecto importante que deve ser levado em consideração é o método de obtenção das VE. Foi observado um aumento dose-dependente na expressão de IFN- γ após 48 horas de cocultivo de PBMC *naive* com VE *tax*+ *HBZ*+, isoladas por precipitação polimérica. Após 72 horas de cocultivo, estes valores caíram para níveis próximos ao basal. Ao contrário, em PBMC cocultivadas com VE *tax*+ *HBZ*+ obtidas por ultracentrifugação, o aumento na expressão de IFN- γ foi observado apenas após 72 horas, sem refletir o efeito dose-dependente observado na condição anterior. A resposta induzida por VE isoladas por precipitação polimérica pode ser resultado da combinação entre VE carregando conteúdo viral e moléculas coprecipitadas por esta

metodologia. Neste sentido, os nossos resultados não excluem a possibilidade de que as alterações observadas em PBMC podem ser uma combinação do efeito de VE tax+ HBZ+ e proteínas presentes no soro de indivíduos infectados. Para elucidar esta questão, investigações complementares são necessárias, como a pesquisa de proteínas do HTLV no soro ou a purificação das VE isoladas por precipitação polimérica.

Estudos funcionais de VE isoladas por precipitação polimérica têm sido cada vez mais observados na literatura (HU et al., 2016; NARDI et al., 2016; ANTOUNIANS et al., 2019) e são uma alternativa rápida ao processo de ultracentrifugação. Portanto, optou-se por realizar o cocultivo de PBMC com as VE isoladas por precipitação polimérica (48 horas) para a avaliação das demais citocinas envolvidas na resposta inflamatória. Esta investigação foi feita pois sabe-se que a infecção pelo HTLV-1 induz a ativação e proliferação dos linfócitos T, mediada principalmente por Tax. Tax também é capaz de induzir a secreção de diversas citocinas inflamatórias, tais como IFN- γ , IL-12, e TNF- α , características de fenótipo Th1 de linfócitos (AHUJA et al., 2007). O fenótipo Th1 manifesta-se principalmente após a ativação de células dendríticas, macrófagos e células NK em resposta a microorganismos intracelulares (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Estudos recentes demonstraram que VE são capazes de induzir uma resposta patógeno-específica em células imunológicas, quando isoladas de células infectadas por *Salmonella Typhimurium* (HUI et al., 2021), HIV (SAMPEY et al., 2016), HBV (KOUWAKI et al., 2016), e do soro de pacientes com Epstein-Barr virus (MRAD et al., 2021). Na infecção pelo HTLV-1, Jaworski e cols. (2014) demonstraram que o cocultivo de células dendríticas com VE tax+ causa um aumento na secreção de citocinas inflamatórias comuns à resposta Th1. Em linfócitos, Anderson e cols. (2018) e Otaguiri e cols. (2018) demonstraram que estas VE causam um aumento na secreção das citocinas IFN- γ e TNF- α e uma sensibilização de linfócitos T citotóxicos a respostas específicas para Tax. Neste sentido, acredita-se que VE tax+ podem auxiliar na polarização para o fenótipo Th1 de linfócitos.

No presente trabalho, a secreção de citocinas inflamatórias foi avaliada no sobrenadante de cultura após o cocultivo de VE tax+ HBZ+ com PBMC *naive* e

PBMC infectadas de pacientes com CPV baixa (11,3 cópias/10⁵ células) e elevada (5.806,3 cópias/10⁵ células). Em PBMC *naive*, apenas a citocina IL-4 apresentou aumento significativo após o tratamento com 2.000 µg/mL de VE controle. Em células não ativadas, a IL-4 é secretada por mastócitos, basófilos e eosinófilos em resposta a helmintos e alérgenos, promovendo a polarização para uma resposta Th2 (ABBAS; LICHTMAN, 2005). Ao contrário do observado neste trabalho, Gehrmann e cols. (2011) demonstraram que VE obtidas do plasma de indivíduos saudáveis não alteram a expressão de IL-4 em PBMC. Deste modo, o aumento observado em nosso estudo pode refletir uma particularidade do doador de sangue no qual as VE foram isoladas, como a presença de mRNA de IL-4 em VE.

Ainda em PBMC *naive*, foi observado aumento a nível proteico e transcricional de IFN-γ após o cocultivo com VE tax+ HBZ+, ainda que sem significado estatístico. Neste contexto, é importante ressaltar a diferença entre as fontes de VE deste trabalho e de trabalhos anteriores que identificaram o aumento de IFN-γ em cocultivo semelhante. Enquanto Jaworski e cols. (2014), Anderson e cols. (2018) e Otaguiri e cols. (2018) obtiveram VE de células em cultivo infectadas pelo HTLV-1, nosso estudo obteve VE do sangue periférico, que carrega VE de diferentes células do organismo. Deste modo, faz-se necessário ampliar o número de amostras para confirmação desta observação.

Foi observado um aumento generalizado na secreção de citocinas inflamatórias em PBMC de CPV elevada, quando comparadas a PBMC *naive* e a PBMC de CPV baixa, independentemente do cocultivo com VE. Este comportamento estava previsto, uma vez que as citocinas selecionadas para análise estão comumente alteradas em pacientes sintomáticos (HAM/TSP). Contudo, PBMC de CPV baixa apresentaram um aumento dose-dependente da citocina IL-8 após o cocultivo com VE tax+ HBZ+, chegando a valores próximos ao detectado em PBMC de CPV alta.

A IL-8 é um agente quimiotático que controla o tráfego de células imunológicas durante a inflamação (PALOMINO; MARTI, 2015). Na infecção pelo HTLV-1, a IL-8 mostra-se comumente alterada em pacientes portadores da HAM/TSP (FUTSCH et al., 2018). Este aumento na expressão de IL-8 está associado à presença da proteína viral tax em linfócitos imortalizados (ZHANG;

SHARMA, 2000), apesar de ser suprimido pela proteína HBZ através da supressão da via clássica de NFκB (ZHAO et al., 2009). Por outro lado, sabe-se que VE atuam no transporte de moléculas, como proteínas e RNAs, através da barreira hematoencefálica (ALVAREZ-ERVITI et al., 2011). O transporte de proteínas alteradas para tecidos do sistema nervoso central, mediado por VE, é um dos mecanismos para a neurodegeneração observada em doenças como Alzheimer, Parkinson e Coreia de Huntington (KALANI; TYAGI; TYAGI, 2014). Em retrovíroses, Hu e cols. (2012) descreveram que VE de astrócitos exercem efeitos neurotóxicos em pacientes HIV sob o uso de opióides. Recentemente, Pinto e cols. (2021) demonstraram aumento na secreção de IL-8 após o tratamento de células do sistema nervoso central com VE liberadas por linhagem celular infectada pelo HTLV-1. Neste contexto, acredita-se que VE podem estar envolvidas no desenvolvimento da neuroinflamação observada no desenvolvimento da HAM/TSP.

Em suma, VE circulantes em portadores do HTLV-1 podem incorporar componentes virais durante a sua biogênese. Este processo está diretamente associado à CPV do indivíduo. A incorporação de componentes virais em VE potencializa a inflamação no organismo, pois causa a desregulação de citocinas inflamatórias em células *naive* e ativadas. Estas observações levantam questões sobre a possibilidade das VE estarem envolvidas no desenvolvimento do estado neuroinflamatório crônico observado em indivíduos HAM/TSP, dada a capacidade das VE de ultrapassarem a barreira hematoencefálica.

6 Conclusões

- I. Os portadores sintomáticos para a infecção pelo HTLV-1 apresentam CPV em média 10 vezes maior que portadores assintomáticos;
- II. As VE isoladas por precipitação polimérica de portadores do HTLV-1 e de doadores de sangue não diferem quanto a presença de marcadores proteicos (Alix, CD9 e GAPDH) ou quanto ao diâmetro e concentração médios;
- III. A detecção dos transcritos virais tax e HBZ em VE circulantes é possível em portadores do HTLV-1 com CPV acima de 6 mil cópias/ 10^5 PBMC. Em VE, a expressão de tais genes mostra-se positivamente correlacionada à CPV apresentada pelo indivíduo;
- IV. As VE tax+ HBZ+ induziram a produção de IL-8 em PBMC de paciente assintomático com CPV reduzida, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento de sintomas na infecção pelo HTLV-1.

Referências

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 2005.
- AHUJA, J. et al. 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. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, n. 4, p. 201–208, maio 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332207000194>>.
- AKIZUKI, S. et al. NECROPSY FINDINGS IN HTLV-I ASSOCIATED MYELOPATHY. **The Lancet**, v. 329, n. 8525, p. 156–157, jan. 1987. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673687919842>>.
- ALBESIANO, E. et al. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. **Blood**, v. 102, n. 9, p. 3333–3339, 1 nov. 2003. Disponível em: <<https://ashpublications.org/blood/article/102/9/3333/17752/Activationinduced-cytidine-deaminase-in-chronic>>.
- ALVAREZ-ERVITI, L. et al. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 341–345, 20 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nbt.1807>>.
- ANDERSON, M. R. et al. Viral antigens detectable in CSF exosomes from patients with retrovirus associated neurologic disease: functional role of exosomes. **Clinical and Translational Medicine**, v. 7, n. 1, p. 24, 27 dez. 2018. Disponível em: <<https://clintransmed.springeropen.com/articles/10.1186/s40169-018-0204-7>>.
- ANTOUNIANS, L. et al. The Regenerative Potential of Amniotic Fluid Stem Cell Extracellular Vesicles: Lessons Learned by Comparing Different Isolation Techniques. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1837, 12 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-38320-w>>.
- ANYANWU, N. C. J. et al. Re-emergence of human T-lymphotropic viruses in West Africa. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 3, p. 224–234, maio 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.05.003>>.

- BERGMAN, J. N. et al. Crusted Scabies in Association with Human T-Cell Lymphotropic Virus 1. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 3, n. 3, p. 148–152, 5 jan. 1999. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/120347549900300310>>.
- BOUVARD, V. et al. A review of human carcinogens—Part B: biological agents. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 4, p. 321–322, abr. 2009. Disponível em: <<https://osha.europa.eu/en/tools-and-publications/publications/factsheets/41>>.
- CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, v. 2, p. 30, 9 maio 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15882466>>.
- CASTRO-COSTA, C. M. de et al. Guia de manejo clínico do paciente com HTLV: aspectos neurológicos. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 63, n. 2b, p. 548–551, jun. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-282X2005000300036&lng=pt&tlng=pt>.
- CATALAN-SOARES, B. et al. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 21, n. 3, p. 926–31, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15868051>>.
- CHIAM, K. et al. Serum outperforms plasma in small extracellular vesicle microRNA biomarker studies of adenocarcinoma of the esophagus. **World Journal of Gastroenterology**, v. 26, n. 20, p. 2570–2583, 28 maio 2020. Disponível em: <<https://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v26/i20/2570.htm>>.
- COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THÉRY, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 30, n. 1, p. 255–89, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25288114>>.
- COSKUN, A. K.; SUTTON, R. E. Expression of Glucose Transporter 1 Confers Susceptibility to Human T-Cell Leukemia Virus Envelope-Mediated Fusion. **Journal of Virology**, v. 79, n. 7, p. 4150–4158, 1 abr. 2005. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.79.7.4150-4158.2005>>.
- COSTA, C. A. da et al. Familial Transmission of Human T-cell Lymphotropic Virus: Silent Dissemination of an Emerging but Neglected Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. e2272, 13 jun. 2013. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002272>>.

- CRENSHAW, B. J. et al. Exosome Biogenesis and Biological Function in Response to Viral Infections. **The Open Virology Journal**, v. 12, n. 1, p. 134–148, 28 set. 2018. Disponível em: <<https://openvirologyjournal.com/VOLUME/12/PAGE/134/>>.
- CRESCITELLI, R. et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 2, n. 1, p. 20677, 12 jan. 2013. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3402/jev.v2i0.20677>>.
- DONEGAN, E. et al. Transfusion transmission of retroviruses: human T-lymphotropic virus types I and II compared with human immunodeficiency virus type 1. **Transfusion**, v. 34, n. 6, p. 478–483, jun. 1994. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1537-2995.1994.34694295061.x>>.
- DOURADO, I. et al. HTLV-I in the General Population of Salvador, Brazil. **JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 34, n. 5, p. 527–531, 2003.
- EL-SAGHIR, J. et al. ATL-derived exosomes modulate mesenchymal stem cells: Potential role in leukemia progression. **Retrovirology**, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2016.
- EL ANDALOSSI, S. et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 5, p. 347–357, 15 maio 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrd3978>>.
- ENOSE-AKAHATA, Y.; VELLUCCI, A.; JACOBSON, S. Role of HTLV-1 Tax and HBZ in the Pathogenesis of HAM/TSP. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, p. 1–10, 21 dez. 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02563/full>>.
- ETOH, K. et al. Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells in vivo. **Cancer research**, v. 57, n. 21, p. 4862–7, 1 nov. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9354450>>.
- FENG, D. et al. **Cellular Internalization of Exosomes Occurs Through Phagocytosis**, maio 2010. . (Nota técnica).
- FUNDAÇÃO HEMOMINAS. **Cadernos Hemominas: HTLV**. 6. ed. [s.l: s.n.]
- FURTADO, M. dos S. B. S. et al. Monitoring the HTLV-1 proviral load in the peripheral blood of asymptomatic carriers and patients with HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from a Brazilian cohort: ROC curve analysis to establish the threshold for risk disease. **Journal of Medical**

- Virology**, v. 84, n. 4, p. 664–671, abr. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.23227>>.
- FUTSCH, N. et al. Cytokine Networks Dysregulation during HTLV-1 Infection and Associated Diseases. **Viruses**, v. 10, n. 12, p. 691, 5 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/10/12/691>>.
- GALLO, R. et al. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). **Science**, v. 220, n. 4599, p. 865–867, 20 maio 1983. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.6601823>>.
- GAUDRAY, G. et al. The Complementary Strand of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 RNA Genome Encodes a bZIP Transcription Factor That Down-Regulates Viral Transcription. **Journal of Virology**, v. 76, n. 24, p. 12813–12822, 15 dez. 2002. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.76.24.12813-12822.2002>>.
- GEHRMANN, U. et al. Nanovesicles from *Malassezia sympodialis* and Host Exosomes Induce Cytokine Responses – Novel Mechanisms for Host-Microbe Interactions in Atopic Eczema. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21480, 22 jul. 2011. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0021480>>.
- GESSAIN, A. et al. ANTIBODIES TO HUMAN T-LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE-I IN PATIENTS WITH TROPICAL SPASTIC PARAPARESIS. **The Lancet**, v. 326, n. 8452, p. 407–410, ago. 1985. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673685927345>>.
- GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. NOV, p. 388, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23162541>>.
- GHEZ, D. et al. Neuropilin-1 Is Involved in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Entry. **Journal of Virology**, v. 80, n. 14, p. 6844–6854, 15 jul. 2006. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.02719-05>>.
- GRASSMANN, R.; ABOUD, M.; JEANG, K.-T. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 5976–5985, 5 set. 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/1208978>>.
- GUENAT, D. et al. Exosomes and other extracellular vesicles in HPV transmission and carcinogenesis. **Viruses**, v. 9, n. 8, p. 1–17, 2017.
- GUERRA, M. et al. Local and systemic production of proinflammatory chemokines in the pathogenesis of HAM/TSP. **Cellular Immunology**, v. 334, n. October, p.

70–77, dez. 2018. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.09.009>>.

HAZIOT, M. E. et al. Detection of clinical and neurological signs in apparently asymptomatic HTLV-1 infected carriers: Association with high proviral load. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 5, p. e0006967, 1 maio 2019. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0006967>>.

HINUMA, Y. et al. Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera (immunofluorescence/lymphoid cell line/specific antibody/type C virus). **Medical Sciences**, v. 78, n. 10, p. 6476–6480, 1981.

HU, G. et al. Exosome-mediated shuttling of microRNA-29 regulates HIV Tat and morphine-mediated Neuronal dysfunction. **Cell Death & Disease**, v. 3, n. 8, p. e381–e381, 30 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/cddis2012114>>.

HU, L. et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–11, 2016.

HUI, W. W. et al. Antigen-encapsulating host extracellular vesicles derived from Salmonella-infected cells stimulate pathogen-specific Th1-type responses in vivo. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 5, p. e1009465, 6 maio 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1009465>>.

HULO, C. et al. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl_1, p. D576–D582, 1 jan. 2011. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkq901>>.

IGAKURA, T. et al. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. **Science (New York, N.Y.)**, v. 299, n. 5613, p. 1713–6, 14 mar. 2003. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1080115>>.

IPINMOROTI, A. O.; MATTHEWS, Q. L. Extracellular vesicles: Roles in human viral infections, immune-diagnostic, and therapeutic applications. **Pathogens**, v. 9, n. 12, p. 1–20, 2020.

IWANAGA, M. et al. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. **Blood**, v. 116, n. 8, p. 1211–1219, 26 ago. 2010.

- Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/cgi/doi/10.1182/blood-2009-12-257410>>.
- JAWORSKI, E. et al. Human T-lymphotropic virus type 1-infected cells secrete exosomes that contain tax protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 32, p. 22284–22305, 2014a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M114.549659>>.
- JAWORSKI, E. et al. Human T-lymphotropic Virus Type 1-infected Cells Secrete Exosomes That Contain Tax Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 32, p. 22284–22305, 8 ago. 2014b. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M114.549659>>.
- JONES, K. S. et al. Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate Attachment and Entry of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Virions into CD4+ T Cells. **Journal of Virology**, v. 79, n. 20, p. 12692–12702, 15 out. 2005. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.79.20.12692-12702.2005>>.
- KAGDI, H. et al. Switching and loss of cellular cytokine producing capacity characterize in vivo viral infection and malignant transformation in human T-lymphotropic virus type 1 infection. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 2, p. e1006861, 14 fev. 2018. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1006861>>.
- KAJIYAMA, W. et al. Intrafamilial Transmission of Adult T Cell Leukemia Virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 154, n. 5, p. 851–857, 1 nov. 1986. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1093/infdis/154.5.851>>.
- KALANI, A.; TYAGI, A.; TYAGI, N. Exosomes: Mediators of Neurodegeneration, Neuroprotection and Therapeutics. **Molecular Neurobiology**, v. 49, n. 1, p. 590–600, 3 fev. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12035-013-8544-1>>.
- KALYANARAMAN, V. et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, n. 4572, p. 571–573, 5 nov. 1982. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.6981847>>.
- KOUWAKI, T. et al. Extracellular vesicles including exosomes regulate innate immune responses to hepatitis B virus infection. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. AUG, 2016.

- LAGRENADE, L. et al. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **Lancet (London, England)**, v. 336, n. 8727, p. 1345–7, 1 dez. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1978165>>.
- LEE, M.-J.; PARK, D.-H.; KANG, J.-H. Exosomes as the source of biomarkers of metabolic diseases. **Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism**, v. 21, n. 3, p. 119, 2016. Disponível em: <<http://e-apem.org/journal/view.php?doi=10.6065/apem.2016.21.3.119>>.
- MANEL, N. et al. HTLV-1 tropism and envelope receptor. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6016–6025, 5 set. 2005. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/1208972>>.
- MANNS, A. et al. Htlv-I and Risk Factors Associated With Seroconversion. v. 891, p. 886–891, 1992.
- MARINHO, J. et al. Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case-control study. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 40, n. 5, p. 625–8, 15 dez. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284541>>.
- MARTINS, M. L. et al. Long-term follow-up of HTLV-1 proviral load in asymptomatic carriers and in incident cases of HAM/TSP: what is its relevance as a prognostic marker for neurologic disease? **Journal of NeuroVirology**, v. 23, n. 1, p. 125–133, 27 fev. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13365-016-0484-x>>.
- MATSUOKA, M.; JEANG, K.-T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 270–280, abr. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrc2111>>.
- MERLE, H. et al. Ocular lesions in 200 patients infected by the human T-cell lymphotropic virus type 1 in martinique (French West Indies). **American Journal of Ophthalmology**, v. 134, n. 2, p. 190–195, ago. 2002. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002939402015210>>.
- MOCHIZUKI, M. et al. Uveitis Associated With Human T-cell Lymphotropic Virus Type I. **American Journal of Ophthalmology**, v. 114, n. 2, p. 123–129, ago. 1992. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002939414739741>>.
- MRAD, M. F. et al. Exosomes From Subjects With Multiple Sclerosis Express EBV-Derived Proteins and Activate Monocyte-Derived Macrophages. **Neurology(R) neuroimmunology & neuroinflammation**, v. 8, n. 4, 2021.

- MURPHY, E. L. et al. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. **International Journal of Cancer**, v. 43, n. 2, p. 250–253, 15 fev. 1989. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.2910430214>>.
- NAGAI, M. et al. Analysis Of Htlv-I Proviral Load In 202 Ham/Tsp Patients And 243 Asymptomatic Htlv-I Carriers: High Proviral Load Strongly Predisposes To Ham/Tsp. **Journal of Neurovirology**, v. 4, n. 6, p. 586–593, jan. 1998. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/13550289809114225>>.
- NARDI, F. da S. et al. High levels of circulating extracellular vesicles with altered expression and function during pregnancy. **Immunobiology**, v. 221, n. 7, p. 753–760, jul. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298516300389>>.
- NASCIMENTO, M. C. F. et al. Infective dermatitis has similar immunological features to human T lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 156, n. 3, p. 455–462, 2009.
- OLINDO, S. et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: A marker of disease progression. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 237, n. 1–2, p. 53–59, out. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022510X05001942>>.
- ORLAND, J. R. et al. Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. **Neurology**, v. 61, n. 11, p. 1588–1594, 9 dez. 2003. Disponível em: <<http://www.neurology.org/cgi/doi/10.1212/01.WNL.0000096011.92542.DA>>.
- OSAME, M. et al. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T-lymphotropic virus type I and adult T-cell leukemialike cells. **Annals of Neurology**, v. 21, n. 2, p. 117–122, fev. 1987. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ana.410210203>>.
- OTAGUIRI, K. K. et al. TAX -mRNA-Carrying Exosomes from Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1-Infected Cells Can Induce Interferon-Gamma Production In Vitro. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 34, n. 12, p. 1075–1082, dez. 2018. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/aid.2018.0115>>.

- PAIVA, A.; CASSEB, J. Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 265–274, jun. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822014000300265&lng=en&tIng=en>.
- PALOMINO, D. C. arolin. T.; MARTI, L. C. avalheir. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015.
- PEINADO, H. et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nature Medicine**, v. 18, n. 6, p. 883–891, 2012.
- PENG, Q.; ZHANG, J.; ZHOU, G. Circulating exosomes regulate T-cell-mediated inflammatory response in oral lichen planus. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 48, n. 2, p. 143–150, fev. 2019. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jop.12804>>.
- PINON, J.D. et al. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Envelope Glycoprotein gp46 Interacts with Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. **Journal of Virology**, v. 77, n. 18, p. 9922–9930, 15 set. 2003. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.77.18.9922-9930.2003>>.
- PINTO, D. O. et al. HTLV-1 Extracellular Vesicles Promote Cell-to-Cell Contact. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. September, p. 1–21, 18 set. 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.02147/full>>.
- PINTO, D. O. et al. Extracellular vesicles from HTLV-1 infected cells modulate target cells and viral spread. **Retrovirology**, v. 18, n. 1, p. 6, 23 dez. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12977-021-00550-8>>.
- PIQUE, C.; JONES, K. S. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. OCT, p. 1–14, 2012. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00378/abstract>>.
- PLEET, M. L. et al. Extracellular vesicles and ebola virus: A new mechanism of immune evasion. **Viruses**, v. 11, n. 5, 2019.
- POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 12, p. 7415–7419, dez. 1980. Disponível em: <<http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.77.12.7415>>.

- POPOVIC, M. et al. The virus of Japanese adult T-cell leukaemia is a member of the human T-cell leukaemia virus group. **Nature**, v. 300, n. 5887, p. 63–66, 1982.
- PRENDERGAST, E. N. et al. Optimizing exosomal RNA isolation for RNA-Seq analyses of archival sera specimens. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–14, 2018.
- PRIMO, J. R. L. et al. Infective Dermatitis and Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis in Childhood and Adolescence. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 4, p. 535–541, 15 ago. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16028164>>.
- RAK, J.; GUHA, A. Extracellular vesicles - vehicles that spread cancer genes. **BioEssays**, v. 34, n. 6, p. 489–497, 2012.
- RAMAKRISHNAIAH, V. et al. Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 32, p. 13109–13113, 2013.
- RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal of Cell Biology**, v. 200, n. 4, p. 373–383, 18 fev. 2013. Disponível em: <<http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.201211138>>.
- REN, T. et al. HTLV-2 Tax Immortalizes Human CD4 + Memory T Lymphocytes by Oncogenic Activation and Dysregulation of Autophagy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 41, p. 34683–34693, 5 out. 2012. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M112.377143>>.
- REZAIE, J. et al. The versatile role of exosomes in human retroviral infections: from immunopathogenesis to clinical application. **Cell and Bioscience**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13578-021-00537-0>>.
- RIBAS, J. G. R.; MELO, G. C. N. de. Mielopatia associada ao vírus linfotrópico humano de células T do tipo 1 (HTLV-1). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 377–384, ago. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v35n4/a15v35n4.pdf>>.
- ROSADAS, C. et al. Estimation of HTLV-1 vertical transmission cases in Brazil per annum. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1–14, 2018.
- SAITO, M. et al. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Retrovirology**, v. 6, n. 1, p. 19, 19 dez. 2009. Disponível em: <<https://retrovirology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4690-6-19>>.

- SALEMI, M.; DESMYTER, J.; VANDAMME, A.-M. Tempo and Mode of Human and Simian T-Lymphotropic Virus (HTLV/STLV) Evolution Revealed by Analyses of Full-Genome Sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 17, n. 3, p. 374–386, 1 mar. 2000. Disponível em: <<http://academic.oup.com/mbe/article/17/3/374/993349>>.
- 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. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-04052017-152911/>>.
- SAMPEY, G. C. et al. Exosomes from HIV-1-infected Cells Stimulate Production of Pro-inflammatory Cytokines through Trans-activating Response (TAR) RNA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 3, p. 1251–1266, 15 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M115.662171>>.
- SCHWARTZ, C. Exosome-Depleted FBS Using Beckman Coulter Centrifugation: The Cost-effective, Consistent Choice. **News-Medical**, p. 18–21, out. 2019. Disponível em: <<https://www.news-medical.net/whitepaper/20161001/Exosome-Depleted-FBS-by-Ultracentrifugation.aspx>>.
- SEIKI, M. et al. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 12, p. 3618–3622, 1 jun. 1983. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.80.12.3618>>.
- SHIOHAMA, Y. et al. Absolute quantification of HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) protein and its plasma antibody in HTLV-1 infected individuals with different clinical status. **Retrovirology**, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2016.
- SILVA, I. C. et al. Moderada endemicidade da infecção pelo vírus linfotrópico-T humano na região metropolitana de Belém, Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 21, n. 0, p. 1–14, 11 out. 2018. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2018000100417&lng=pt&tlng=pt>.
- SILVA, I. N. R. et al. Prevalência de *Strongyloides stercoralis* em portadores do Vírus Linfotrópico-T Humano (HTLV) atendidos no Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e23310212316, 14 fev. 2021. Disponível em: <<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/12316>>.

- STARLING, A. L. B. et al. Immunological signature of the different clinical stages of the HTLV-1 infection: establishing serum biomarkers for HTLV-1-associated disease morbidity. **Biomarkers**, v. 20, n. 6–7, p. 502–512, 3 out. 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1354750X.2015.1094141>>.
- SUKRITI, S. et al. Extracellular vesicles from hepatitis B patients serve as reservoir of hepatitis B virus DNA. **Journal of Viral Hepatitis**, v. 26, n. 1, p. 211–214, jan. 2019. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jvh.12995>>.
- TANAJURA, D. et al. Neurological Manifestations in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1)–Infected Individuals Without HTLV-1–Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis: A Longitudinal Cohort Study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 1, p. 49–56, 1 jul. 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1093/cid/civ229>>.
- TAYLOR, D. D.; SHAH, S. Methods of isolating extracellular vesicles impact downstream analyses of their cargoes. **Methods**, v. 87, p. 3–10, out. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.02.019>>.
- THÉRY, C. et al. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 30, n. 1, p. 3.22.1-3.22.29, mar. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18228490>>.
- THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of extracellular vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30637094>>.
- TOSSWILL, J. H. et al. HTLV-I/II associated disease in England and Wales, 1993-7: retrospective review of serology requests. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 320, n. 7235, p. 611–2, 4 mar. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10698878>>.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6. ed. [s.l: s.n.]
- TSCHACHLER, E.; FRANCHINI, G. Infective dermatitis: a pabulum for human T-lymphotrophic virus type I leukemogenesis? **Archives of Dermatology**, v. 134, n. 4, p. 487–488, 1998.
- WALKER, P. J. et al. Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on

Taxonomy of Viruses (2019). **Archives of Virology**, v. 164, n. 9, p. 2417–2429, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00705-019-04306-w>>.

WOLFE, N. D. et al. Naturally acquired simian retrovirus infections in central African hunters. **The Lancet**, v. 363, n. 9413, p. 932–937, mar. 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673604157875>>.

WOLFE, N. D. et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 22, p. 7994–7999, 31 maio 2005. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0501734102>>.

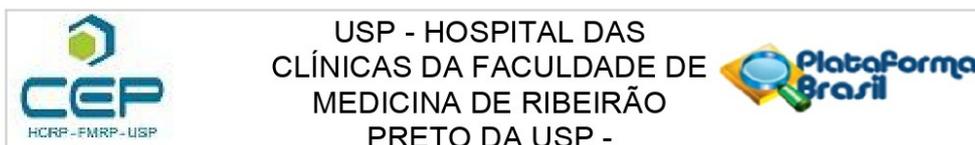
YARI, A. et al. Evaluation of HTLV-1 activity in HAM/TSP patients using proviral load and Tax mRNA expression after In Vitro lymphocyte activation. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 17, n. 7, p. 531–6, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22917680>>.

YOSHIKAWA, F. S. Y. et al. Delivery of microRNAs by Extracellular Vesicles in Viral Infections: Could the News be Packaged? **Cells**, v. 8, n. 6, p. 611, 2019.

ZHANG, L.; SHARMA, V. Human T-cell lymphotropic virus type-I tax gene induces interleukin-8 secretion by autocrine mechanism and has no effect on interleukin-16 in transfected Jurkat cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 273, n. 3, p. 865–869, 2000.

ZHAO, T. et al. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. **Blood**, v. 113, n. 12, p. 2755–2764, 23 jan. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/onc2010537>>.

Apêndice I – Aceite do comitê de ética em pesquisa. Este trabalho está vinculado ao projeto de pesquisa intitulado "Vesículas extracelulares: identificação de biomarcadores em infecções virais crônicas" (Processo HCRP: 9179/2019).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Vesículas extracelulares: identificação de biomarcadores em infecções virais crônicas.

Pesquisador: Elaine Vieira Santos

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 18056219.1.1001.5440

Instituição Proponente: Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.539.198

Apresentação do Projeto:

Trata-se de EMENDA ao projeto de pesquisa conforme carta datada de 28 de agosto de 2019.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar biomarcadores para o diagnóstico e/ou prognóstico na infecção pelo HTLV-1 por meio da caracterização molecular de vesículas extracelulares (exossomos) do plasma de indivíduos infectados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

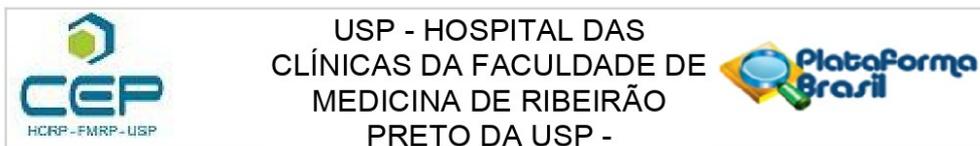
Não modificado com a emenda.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Justificativa da Emenda:

O projeto versão 02 data 13/08/2019, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico versão 01 data 29/07/2019 foram enquadrados na categoria aprovado, conforme a legislação vigente. No entanto, o preenchimento da Plataforma Brasil como estudo multicêntrico não é pertinente para este estudo. Visto que o Hemocentro de Ribeirão Preto e o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP) fazem uma única instituição. Neste sentido,

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.539.198

solicito a exclusão do HCFMRP como instituição Co-participante e a adequação do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) para Instituição Co-participante (listado como Participante). As respectivas cartas de anuência encontram-se em anexo. Com base nos esclarecimentos acima, esperamos contar com a compreensão e o valioso apoio desta comissão para o desenvolvimento de nosso estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos encaminhados na emenda:

- CARTAEMENDACEP_HTLV1.pdf

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

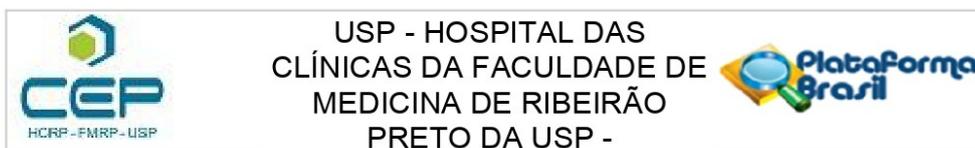
O CEP analisou e aprovou a EMENDA referente à correção das instituições participantes no projeto de pesquisa: exclusão do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto como instituição co-participante e alteração do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) de centro participante para instituição co-participante.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1423486_E1.pdf	28/08/2019 12:01:27		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	CARTAEMENDACEP_HTLV1.pdf	28/08/2019 11:57:50	Elaine Vieira Santos	Aceito
Parecer Anterior	CARTAPARECERCONSUBSTANCIAD OCEP_HTLV1.pdf	14/08/2019 16:30:14	Elaine Vieira Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOELAINE_2.pdf	14/08/2019 16:29:51	Elaine Vieira Santos	Aceito
Outros	ENCAMINHAMENTO_PROJETO_UPC.pdf	29/07/2019 16:03:16	Elaine Vieira Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	29/07/2019 16:02:56	Elaine Vieira Santos	Aceito
Declaração de Manuseio Material	DECLARACAO_BIORREPOSITORIO.pdf	26/07/2019 16:52:28	Elaine Vieira Santos	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRAO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 3.539.198

Biológico / Biorepositório / Biobanco	DECLARACAO_BIORREPOSITORIO.pdf	26/07/2019 16:52:28	Elaine Vieira Santos	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO_PROJETOPLATAFORMABRASIL_ELAINE.pdf	26/07/2019 16:41:48	Elaine Vieira Santos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DECLARACAO_INSTITUICAO_INFRAESTRUTURA.pdf	26/07/2019 16:40:54	Elaine Vieira Santos	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	15/07/2019 14:57:16	Elaine Vieira Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_ANUENCIA_IIER_FMUSP.jpg	12/07/2019 14:59:30	Elaine Vieira Santos	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CARTA_ANUENCIA_NTR_HCFMRP.pdf	12/07/2019 14:59:14	Elaine Vieira Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 28 de Agosto de 2019

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
 (Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Apêndice II – Termo de consentimento livre e esclarecido para coleta e guarda de material biológico

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE
MATERIAL BIOLÓGICO

Título da pesquisa: *VESÍCULAS EXTRACELULARES: IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES EM INFECÇÕES VIRAIS CRÔNICAS.*

Pesquisadores responsáveis: Profa. Dra. Simone Kashima Haddad e Dra. Elaine Vieira Santos.

Telefone para contato: (16) 2101-9300 Ramal 9606 ou 9680.

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento em duas vias. Caso o(a) senhor(a) não aceite participar da pesquisa, não será penalizado(a) de forma alguma e seu atendimento não será prejudicado na Instituição.

O objetivo da pesquisa é estudar a infecção pelo HTLV (vírus linfotrópico de células T humanas) e identificar marcadores biológicos que possam estar ligados ao desenvolvimento de doenças associadas à infecção viral.

Caso concorde em participar, o (a) senhor(a) deverá permitir a coleta de uma amostra de sangue total. Não haverá nenhuma despesa, nenhum ganho financeiro e nenhum prejuízo aos indivíduos que participarem deste estudo.

Os riscos ou desconfortos da pesquisa são relacionados à coleta de sangue, por exemplo um desconforto passageiro devido a picada da agulha. Para minimizar os riscos a coleta de sangue será realizada por profissionais experientes da área de enfermagem com materiais descartáveis e estéreis.

Os benefícios esperados da pesquisa são de auxiliar-nos a melhorar o entendimento das complicações clínicas em indivíduos infectados pelo HTLV. Para tanto, não existem benefícios diretos aos pacientes do estudo.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária e o(a) senhor(a) tem liberdade de deixar de participar a qualquer momento, é só avisar algum dos pesquisadores. Caso não aceite participar o seu tratamento no Hospital será o mesmo.

Será mantido sigilo absoluto dos dados obtidos individualmente neste estudo, para assegurar a privacidade dos participantes. Caso o(a) senhor(a) se sinta prejudicado em participar desta pesquisa, o(a) senhor(a) poderá buscar indenização de acordo com as normas vigentes no país.

Os pesquisadores estarão disponíveis para qualquer dúvida a qualquer momento durante o estudo e o sr.(a) tem a garantia de acesso aos resultados da pesquisa.

Caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa, o(a) senhor(a) também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionar pesquisas em seres humanos que são realizadas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto é localizado no subsolo do hospital e funciona de segunda a sexta-feira, das 8:00 às 17:00hs, telefone de contato (016) 3602-2228.

Esta pesquisa está vinculada ao biorrepositório **HTLV** criado no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto ou na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com o objetivo de guardar amostras de células sanguíneas, DNA, RNA e plasma para complementação diagnóstica e utilização futura em pesquisas. Gostaríamos de convidá-lo (a) a autorizar a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do material biológico humano composto por células sanguíneas, DNA, RNA e plasma para fins de pesquisa e análise científica.

Este material será coletado durante o atendimento clínico no ambulatório de Neurologia Tropical do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão

Preto (NTR-HCFMRP). Após coletado será guardado em biorrepositório localizado no Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto, Rua Tenente Catão Roxo, 2501, Ribeirão Preto, São Paulo, telefone (16) 2101-9300 ramal 9606 ou 9680, onde as amostras serão armazenadas por tempo indeterminado. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o seu sigilo e a sua confidencialidade, para isso a sua amostra de células sanguíneas, DNA, RNA e plasma serão identificadas por meio das iniciais HTLV e números sequenciais.

Quanto ao material, será coletado 5 mL (1 colher de chá) de sangue. Em decorrência da coleta pode ocorrer um desconforto passageiro devido a picada da agulha no momento da coleta de sangue. Para amenizar os riscos e desconfortos será realizada compressão local e se necessário o uso de compressas frias para atenuar a dor local.

Sua participação é voluntária, tendo liberdade de aceitar ou não que sua amostra seja guardada, sem risco de qualquer penalização ou prejuízo no atendimento que lhe for prestado. O (A) Sr. (a) também tem o direito de retirar seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado a qualquer momento.

Solicitamos também os dados de contato do(a) senhor(a), para que seja possível encontrá-lo(a) posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber eventuais benefícios provenientes do estudo com seu material biológico. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado em casos de amostras coaguladas ou com hemólise.

Declaramos para os devidos fins que a cada a nova pesquisa o Sr.(a) será contatado para a utilização do seu material biológico armazenado neste biorrepositório, e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Solicitamos seus dados de contato e sua assinatura, tendo recebido as informações acima, para confirmação de aceitação de participação. Também

afirmamos que uma via deste documento, devidamente assinada e rubricada, será entregue ao senhor (a).

Dados do participante:

Nome: _____, RG: _____,
Endereço: _____, nº _____,
Bairro _____, cidade _____, telefone(____) _____

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor(a) tenha alguma dúvida posteriormente.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ data: _____

Nome do pesquisador: _____

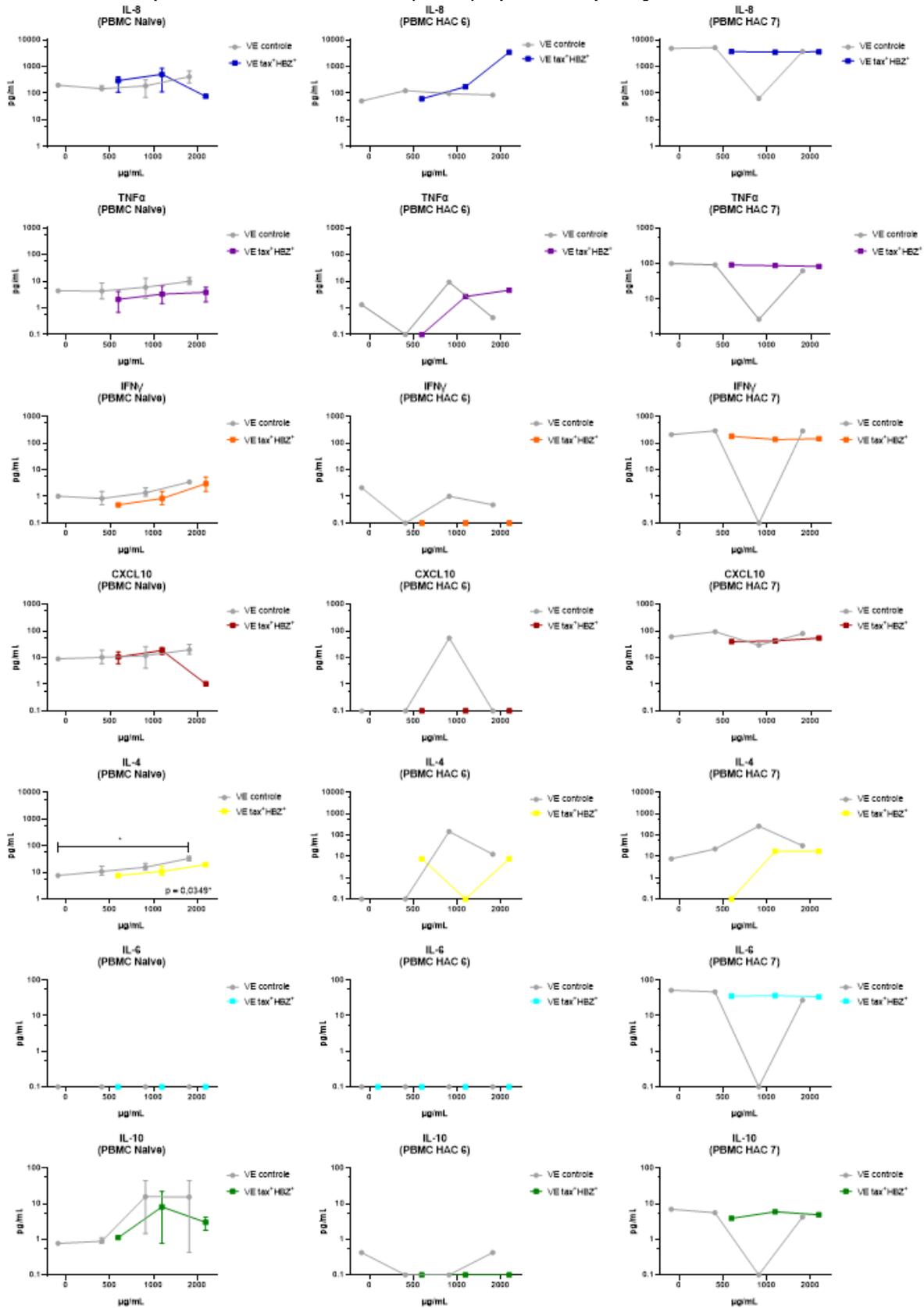
Assinatura: _____ data: _____

Dados do responsável legal ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____ data: _____

Apêndice I - Secreção de citocinas inflamatórias por PBMC de indivíduos saudáveis e indivíduos portadores do HTLV-1 (HAC) após a exposição às VE tax⁺ e HBZ⁺.



As PBMC *naive* foram testadas em triplicata. As PBMC infectadas (HAC) foram testadas em unicata. HAC: PBMC de portador assintomático do HTLV-1. Fonte: Própria.