

GIOVANNA PEREZ MELLO SANTOS

ESTUDO DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES
INFLAMATÓRIOS NO PLASMA DE INDIVÍDUOS
VIVENDO COM HTLV-1



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

ABRIL / 2022

Trabalho realizado no Departamento de Imunologia do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Juliana Echevarria Lima.

CIP - Catalogação na Publicação

P237e Perez Mello Santos, Giovanna
ESTUDO DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NO
PLASMA DE INDIVÍDUOS VIVENDO COM HTLV-1 / Giovanna Perez
Mello Santos. -- Rio de Janeiro, 2022.
52 f.

Orientadora: Juliana Echevarria Lima.
Trabalho de conclusão de curso (graduação)
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. HTLV-1. 2. MAH/PET. 3. Mediadores
inflamatórios. 4. UFRJ. Instituto de Microbiologia
Paulo de Góes. I. Echevarria Lima, Juliana, orient.
II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a
responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA**

ALUNO: Giovanna Perez Mello Santos

DRE: 118023518

BANCA EXAMINADORA: Profa. Luciana Jesus da Costa (Presidente)
Prof. Anderson Guimarães
Dr. Mauro Jorge Cabral Castro
Prof. Herbert Leonel de Matos Guedes (Suplente)

Título da Monografia: **“ESTUDO DE ALTERAÇÕES EM SUBSTÂNCIAS
NO PLASMA DE INDIVÍDUOS VIVENDO COM HTLV-1”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/ydp-mnkw-end>

Data e hora de início: **11 de abril de 2022 às 14:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,5 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 11 de Abril de 2022.

NOTA

___ 9,5 ___

___ 9,5 ___

___ 9,5 ___

Banca Examinadora:

Profa. Luciana Jesus da Costa

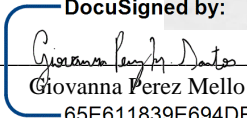
Prof. Anderson Guimarães

Dr. Mauro Jorge Cabral Castro

Presidente da banca


Profa. Luciana Jesus da Costa
DocuSigned by:

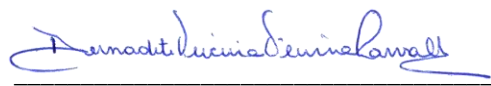
Aluno:


Giovanna Perez Mello Santos
65E611839E694DE...

Orientador:


Profa. Juliana Echevarria Lima

Coordenador
de TCC


Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Ao meu incrível tio Antonio, que não pôde acompanhar ao meu lado essa conquista, pela inspiração para seguir em frente.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Prof^ª. Juliana Echevarria Lima pela orientação, apoio, paciência e gentileza durante os anos em que estive em seu laboratório.

Aos demais professores do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, por compartilharem seus conhecimentos e auxiliarem na minha compreensão.

Aos companheiros do Laboratório de Imunologia Básica e Aplicada, pela ajuda, simpatia e acolhimento.

Ao Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da FIOCRUZ e aos participantes do presente estudo, pela contribuição ao trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela contribuição financeira.

Às minhas queridas amigas da UFRJ, pela companhia, pelas sessões de estudo, pelos choros e risadas compartilhados, pelo apoio constante e incessável durante todos esses anos.

Aos meus avós, já que sem eles eu não teria chegado aqui.

E à minha mãe, por seu amor, carinho e entusiasmo, e por me auxiliar de diversas maneiras durante a escrita deste trabalho.

RESUMO

Giovanna Perez Mello Santos

ESTUDO DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NO PLASMA DE INDIVÍDUOS VIVENDO COM HTLV-1

Orientadora: Juliana Echevarria Lima

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O vírus linfotrópico de células T humano do tipo 1 (HTLV-1) estabelece uma infecção persistente em humanos e é capaz de promover o aparecimento de quadros graves em pacientes, como a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e doenças inflamatórias não-neoplásicas como a mielopatia associada à infecção pelo HTLV-1/paraparesia espástica tropical (MAH/PET). A MAH/PET é uma doença desmielinizante de progressão lenta, negligenciada e socialmente devastadora. Cerca de 8% dos pacientes apresentam rápido declínio do quadro neurológico, que leva à fraqueza espástica de membros inferiores. O tratamento para essas condições graves induzidas pelo vírus ainda é limitado, o que afeta desfavoravelmente o prognóstico dos pacientes. O desenvolvimento de lesão neurológica promove o aumento dos níveis de mediadores inflamatórios como IFN-gama, TNF-alfa, GM-CSF e IL-1-beta, além de quimiocinas como CXCL9 e CXCL10, que podem ser detectados no líquido de pacientes com MAH/PET. A fim de melhorar o entendimento do surgimento e progressão da doença neurológica, nos propomos a estudar alterações em componentes do plasma de indivíduos portadores de MAH/PET e assintomáticos (ACs), através da avaliação dos níveis de proteínas totais, D-aminoácido oxidase (DAO), interleucina 6 (IL-6), CXCL10, metaloproteinase-2 (MMP-2), atividade de lactato desidrogenase (LDH) e nitrito em amostras de indivíduos vivendo com HTLV-1 (ACs e MAH/PET) e não infectados. No plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1, ACs e MAH/PET, foram encontrados níveis mais altos de CXCL10 comparados aos níveis encontrados em indivíduos não infectados. Embora os níveis de DAO sejam semelhantes entre os indivíduos vivendo com HTLV-1 AC e MAH/PET, foi encontrada uma correlação negativa entre estes níveis e de CXCL10. Por outro lado, foram detectados níveis mais baixos de atividade LDH nos indivíduos vivendo com HTLV-1, ACs e MAH/PET. Também foram identificadas diferenças nas concentrações de nitrito no plasma, com níveis mais elevados sendo encontrados em pacientes vivendo com HTLV-1 ACs, quando em comparação aos portadores de MAH/PET. Os níveis de MMP2 e nitrito se correlacionam negativamente com o grau de incapacidade motora dos pacientes, sugerindo uma possível associação com o tempo do dano neurológico. Acreditamos que este estudo possa contribuir para o entendimento de alterações proteicas apresentadas no plasma de indivíduos MAH/PET e suas possíveis correlações com o desenvolvimento e avanço da doença neurológica.

Palavras-chave: HTLV-1, MAH/PET, plasma, progressão, mediadores inflamatórios

ABSTRACT

Giovanna Perez Mello Santos

STUDY OF POSSIBLE INFLAMMATORY BIOMARKERS IN PLASMA SAMPLES OF INDIVIDUALS LIVING WITH HTLV-1

Orientador: Juliana Echevarria Lima

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

The human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) establishes a persistent infection in humans, and is capable of promoting the emergence of severe conditions in patients, such as adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL), and non-neoplastic inflammatory diseases, such as HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). HAM/TSP is a neglected and socially devastating, demyelinating disease with slow progression. About 8% of patients show quick decline in neurological condition, which leads to spastic weakness of lower limbs. Treatment for these severe conditions caused by the virus is still limited, affecting patient prognosis unfavorably. Development of neurological lesion promotes increase in levels of inflammatory mediators such as IFN-gamma, TNF-alpha, GM-CSF and IL-1-beta, along with chemokines such as CXCL9 and CXCL10, which can be detected in cerebrospinal fluid of patients with HAM/TSP. We aimed to contribute to the further understanding of neurological disease onset and progression on HTLV-1 patients by studying alterations in specific plasma components of individuals with HAM/TSP and asymptomatic carries (ACs), by evaluating total protein levels, D-amino acid oxidase (DAO), interleukin 6 (IL-6), CXCL10, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), nitrate and lactate dehydrogenase (LDH) activity in plasma samples of individuals living with HTLV-1 (ACs and HAM/TSP) and uninfected controls. In plasma from individuals living with HTLV-1 (ACs and HAM/TSP), higher levels of CXCL10 were found, when compared to those found in uninfected controls. Although DAO levels were similar between patients with HTLV-1, a negative correlation was found between these and CXCL10 levels. On the other hand, lower levels of LDH activity were detected in individuals living with HTLV-1, ACs and HAM/TSP. Differences in plasma nitrite concentrations were also identified, with higher levels being found in asymptomatic HTLV-1 patients, when in comparison to HAM/TSP patients. MMP-2 and nitrite levels are negatively correlated with the degree of motor disability of the patients, suggesting a possible association with the duration of neurological damage. We believe that this study may contribute to the understanding of protein alterations presented in the plasma of HAM/TSP patients and their possible correlations with the development and progress of neurological disease.

Key-words: HTLV-1, HAM/TSP, plasma, progression, inflammatory mediators

RESUMO PARA LEIGOS

Giovanna Perez Mello Santos

ESTUDO DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS NO PLASMA DE INDIVÍDUOS VIVENDO COM HTLV-1

Orientador: Juliana Echevarria Lima

Resumo em linguagem leiga da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O vírus linfotrópico de células T humano do tipo 1 (HTLV-1) estabelece uma infecção persistente em humanos e é capaz de promover o aparecimento de quadros graves em pacientes, como a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e doenças inflamatórias como a mielopatia associada à infecção pelo HTLV-1/paraparesia espástica tropical (MAH/PET). A MAH/PET é uma doença de progressão lenta negligenciada socialmente devastadora, causando, entre outros quadros, fraqueza nos membros inferiores. O tratamento para essas condições graves induzidas pelo vírus ainda é limitado, o que afeta desfavoravelmente a qualidade de vida dos pacientes. O desenvolvimento de MAH/PET promove o aumento de substâncias que podem ser detectadas no líquido e no plasma desses indivíduos. A fim de melhorar o entendimento do surgimento e progressão da doença neurológica, nos propomos a estudar alterações em componentes do plasma de indivíduos portadores de MAH/PET e indivíduos vivendo de HTLV-1 que não apresentam quadro aparente de doença. Foram constatadas alterações significativas nos níveis de alguns componentes com papel importante em processos inflamatórios, sugerindo relação dessas moléculas com mecanismos da doença, e possibilidade de utilização como indicadores do desenvolvimento de MAH/PET.

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
RESUMO PARA LEIGOS	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 HTLV-1	1
1.2 Transmissão entre indivíduos e diagnóstico	4
1.3 Doenças associadas à infecção por HTLV-1	6
1.4 Mediadores inflamatórios e MAH/PET	7
2 JUSTIFICATIVA	15
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo geral	15
3.2 Objetivos específicos	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 População estudada e obtenção de amostras	16
4.2 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de D-aminoácido oxidase (DAO)	17
4.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de CXCL10, IL-6 e MMP-2	17
4.4 Análise da atividade da Lactato Desidrogenase (LDH)	18
4.5 Análise de proteínas totais	19
4.6 Análise dos níveis de Nitrito	19
4.7 Análises estatísticas	19
5 RESULTADOS	21
5.1 Análise dos níveis de proteínas totais no plasma	21
5.2 Comparação entre os níveis de DAO	22
5.3 Níveis plasmáticos de CXCL10 e IL-6 em pessoas vivendo com HTLV-1	22
5.4 Níveis plasmáticos de MMP-2 em pessoas vivendo com HTLV-1	24
5.5 Análise dos níveis de atividade LDH e nitrito no plasma	25
6 DISCUSSÃO	27
7 CONCLUSÃO	32
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
9 ANEXO	41

1. INTRODUÇÃO

1.1. HTLV-1

Em 1977, 16 casos de leucemia de células T com características em comum, como linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e núcleo em forma de flor, levantaram dúvida sobre a origem desse quadro. 13 dos 16 pacientes estudados haviam nascido na mesma região do Japão (Uchiyama *et al.*, 1977). Ao final da década de 1970, após o estudo de uma amostra de células de um paciente portador de linfoma cutâneo de células T, o pesquisador norte-americano Robert C. Gallo e sua equipe isolaram e identificaram o primeiro retrovírus humano com capacidade de causar câncer, que foi denominado HTLV-1 (*Human cutaneous T-cell lymphoma virus*, ou vírus de linfoma cutâneo de células T humano) (Poiesz *et al.*, 1980). Após a identificação do HTLV-1, foi constatado que o vírus era o agente etiológico observado nos casos dos pacientes japoneses em 1977 (Gallo, 2005). Essa descoberta se tornou marco inicial no estudo de retrovírus humanos, e também foi importante para solidificar o conceito de oncogênese viral. Posteriormente, em 1981, o grupo do Dr. Gallo isolou um vírus semelhante que foi denominado HTLV-2, a partir de células de um paciente com leucemia de células pilosas. Em 1985, após a identificação da presença de anticorpos específicos para o vírus de linfoma cutâneo de células T humano em pacientes portadores de paraparesia espástica tropical, o vírus passou a ser chamado de *Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1* (HTLV-1, vírus linfotrópico de células T humano do tipo I), nome utilizado até hoje (Gallo, 2005). Mais recentemente, também foram isolados HTLV-3 e HTLV-4, em 2005, a partir de indivíduos na África (Mahieux e Gessain, 2011).

Atualmente, há pouco conhecimento sobre a real prevalência e distribuição global do vírus, principalmente em áreas muito populosas da Ásia e África. Em todo o mundo, estima-se que existam entre 5 a 10 milhões de pessoas infectadas por HTLV-1 (Gessain e Cassar, 2012). Esses dados atualizados foram baseados apenas na quantidade de 1,5 bilhões de indivíduos originários de áreas endêmicas com dados epidemiológicos confiáveis disponíveis, o que excluiu áreas altamente populosas como China, Índia e o Leste da África. Assim, o número real de indivíduos infectados por HTLV-1 tem alta probabilidade de ser maior que o estimado (Gessain e Cassar, 2012). Estudos epidemiológicos apontam que o maior número de casos está concentrado na África, Japão, Caribe e América do Sul. O Japão e o continente Africano são consideradas as duas regiões com maior número de indivíduos infectados, seguidas da América do Sul, considerada foco importante de doenças associadas ao HTLV-1. No Brasil, são

estimados 800 mil indivíduos infectados por HTLV-1, sendo considerado um dos países com o maior número absoluto de casos (Rosadas *et al.*, 2020).

O HTLV-1 é um vírus pertencente ao gênero *Deltaretrovirus*, com uma partícula viral esférica e envelopada (**Figura 1**), medindo entre 100 e 140 nm de diâmetro. As glicoproteínas gp21 e gp46 estão localizadas no envelope viral e são importantes para a ligação do vírus ao receptor da célula e para a fusão do envelope com a membrana da célula. O capsídeo proteico, formado pelas proteínas p15, p19 e p24, contém o genoma viral, que apresenta duas cópias de RNA de fita simples de polaridade positiva (ligado em um RNA transportador para sinalizar a síntese de DNA), protease, transcriptase reversa, integrase e RNase H (Poiesz *et al.*, 1980, 1981; Gallo, 2005; Brites *et al.*, 2021). O vírus estabelece uma infecção persistente em humanos.

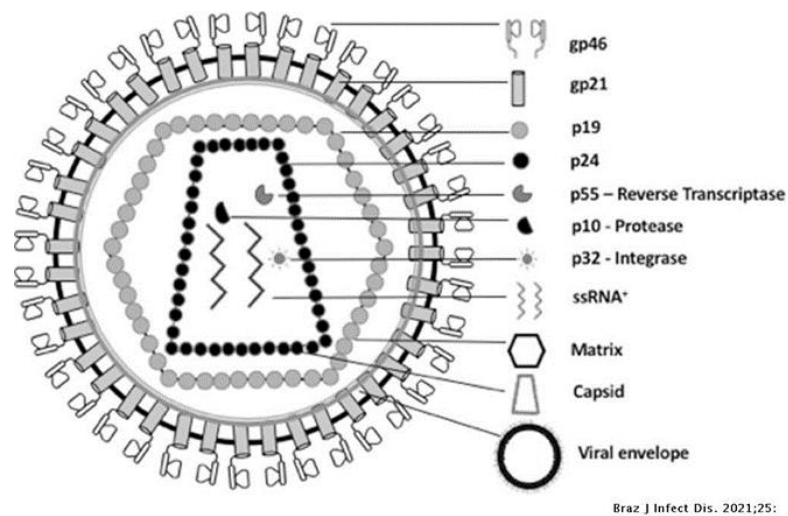


Figura 1 – Representação esquemática dos componentes morfológicos de HTLV-1/2 (Brites *et al.*, 2021).

Além de possuir genes estruturais comuns a outros retrovírus, como *gag*, que codifica as proteínas p19, p24 e p15; *pol*, que codifica a transcriptase reversa, RNase H e integrase; *pro*, que codifica a protease viral; e *env*, que codifica as glicoproteínas da membrana lipídica externa; o HTLV-1 também possui uma região denominada *pX*, posicionada entre *env* e a extremidade 3' LTR, que codifica 4 sequências de leitura aberta (*open reading frames*, ORF). Os mRNA transcritos a partir da região *pX* codificam proteínas reguladoras (Tax e Rex) e acessórias (p12/p8, p13, p21 e p30), assim como a proteína HBZ (*HTLV-1 basic leucine zipper*). Essas proteínas, em especial Tax, Rex e HBZ, têm, entre outras funções, papel na replicação e

proliferação viral e na imortalização de células infectadas (Zhao e Matsuoka, 2012; Fuzii *et al.*, 2014; Gross e Thoma-Kress, 2016).

A infecção de uma nova célula ocorre pela ligação de receptor Glut-1 em associação a neuropilina-1 ou heparan sulfato com a proteína de superfície viral gp46/gp21, promovendo fusão e a entrada na célula. Em seguida, o material genético viral sofre a transcrição reversa (através da enzima viral transcriptase reversa), sendo transcrito em DNA de fita dupla que pode se integrar ao genoma celular após migrar para o núcleo (Martin *et al.*, 2016).

As principais células infectadas pelo vírus são linfócitos T CD4⁺, mas também foi relatada presença do vírus em células dendríticas, linfócitos B e monócitos de indivíduos infectados (Cook *et al.*, 2013; Gross e Thoma-Kress, 2016; Nascimento *et al.*, 2011). Em linfócitos T, foi vista uma alteração na forma das células infectadas, que se tornam maiores e irregulares (Bangham *et al.*, 2015) (**Figura 2**). A persistência e propagação da infecção ocorre, principalmente, pela multiplicação exacerbada das células infectadas, por divisão mitótica e proliferação clonal. Assim, associado à infecção de novas células pelo contato célula-célula, mantém-se uma alta a carga pró-viral (Gross e Thoma-Kress, 2016).

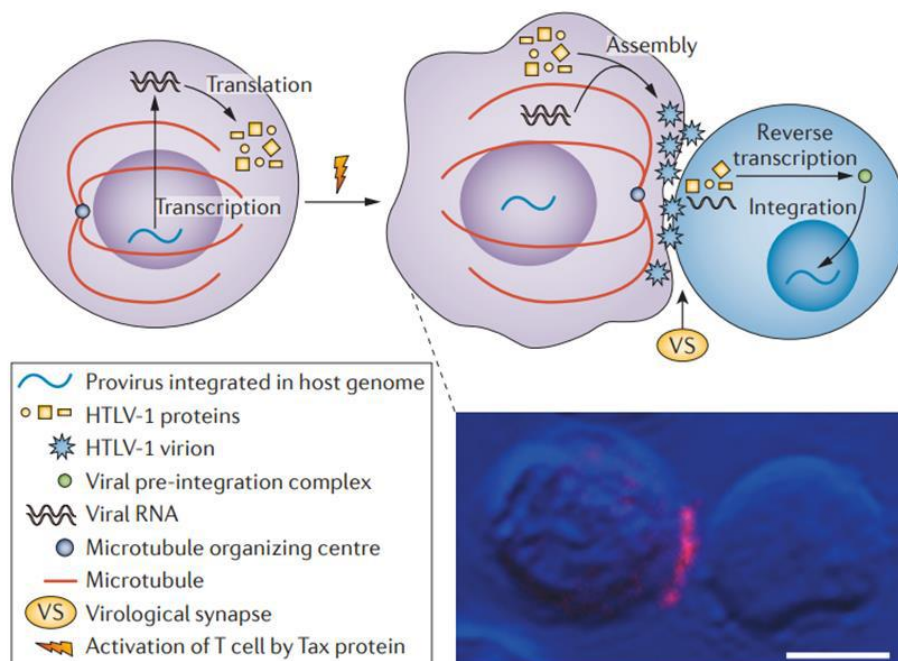


Figura 2 – Integração do HTLV-1 ao genoma da célula infectada e transmissão. Na célula infectada, o pró-vírus já integrado ao genoma do hospedeiro é transcrito em RNA, que por sua

vez é traduzido para formar as proteínas estruturais e regulatórias do vírus. Além disso, a infecção leva a ativação celular com indução da expressão de moléculas de adesão em sua superfície. Esse efeito favorece a transmissão do vírus, que, geralmente, ocorre através do contato célula a célula (Bangham *et al.*, 2015).

1.2. Transmissão entre indivíduos e diagnóstico

A transmissão do HTLV-1 ocorre por via horizontal, por relações sexuais ou contato invasivo com sangue de indivíduos infectados (materiais contaminados, transfusão sanguínea ou transplante de órgãos) ou vertical, de mãe para filho por via intrauterina, durante o parto ou através da amamentação, sendo essa mais comum em regiões endêmicas (Percher *et al.*, 2016; Rosadas *et al.*, 2018).

É entendido que a amamentação prolongada, por meio da qual são transferidas células infectadas de mãe para filho, tem como risco a infecção da criança pelo HTLV-1. Estudos demonstraram relação direta entre o tempo de amamentação e o risco de infecção por HTLV-1 em bebês de mães portadoras do vírus. Ainda que sejam necessários maiores estudos sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da infecção a partir do leite materno quanto dos mecanismos envolvidos no agravamento do quadro, é vista uma relação entre a infecção durante a infância e o desenvolvimento de quadros graves associados à infecção por HTLV-1 em pacientes (Rosadas *et al.*, 2018).

Um estudo realizado em novembro de 2018 estimou que dos aproximados 800,000 indivíduos infectados por HTLV-1 no Brasil, 3.024 novos casos ocorreriam devido a transmissão vertical, em maior parte por meio da amamentação (evitável através de amamentação alternativa), com uma parcela menor dos casos atribuída a infecção durante o parto (não evitável) (Rosadas *et al.*, 2018).

Como é feito para o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) e outros vírus, a testagem para o HTLV-1 é realizada em bancos de sangue no país desde 1993. Porém, diferentemente de como ocorre com HIV-1 e uma diversidade de outros microrganismos patogênicos, não é obrigatório o diagnóstico para HTLV-1 durante o pré-natal no Sistema Único de Saúde (SUS), o que amplia o risco da transmissão vertical do vírus no Brasil.

O diagnóstico do HTLV-1 é feito em duas etapas: triagem, onde são utilizados testes sorológicos como ELISA para detectar a presença de anticorpos anti-HTLV em amostras do indivíduo, e confirmação, para qual normalmente é utilizado Western Blot (Verdonck *et al.*, 2007). Um exemplo de teste confirmatório de HTLV-1 por Western Blot pode ser observado na **figura 3**.

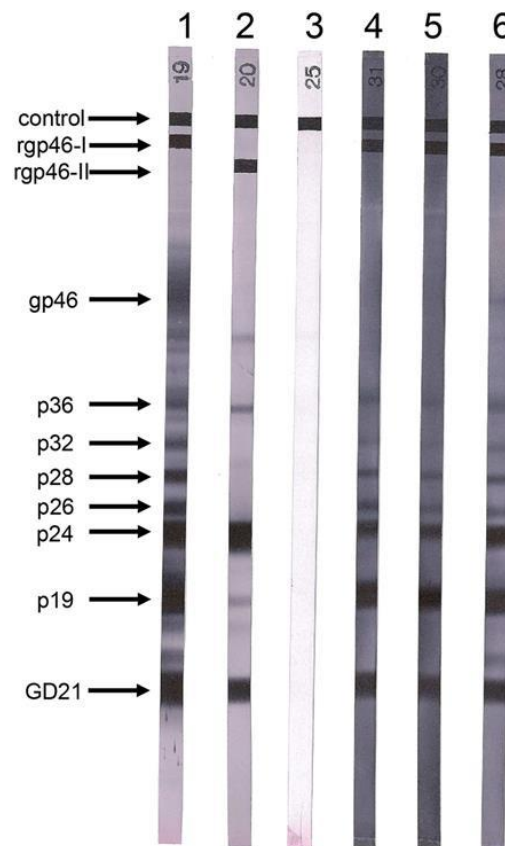


Figura 3 – Confirmação sorológica de HTLV-1 por Western Blot. (1) Controle HTLV-1 positivo; (2) Controle HTLV-2 positivo; (3) Controle HTLV-1/2 negativo; (4-6) Amostras de plasma demonstrando alta reatividade a GD21, p19, p24, p26, p28, p32, p36 e rgp46-I (MTA-1, peptídeo sintético específico para HTLV-1) (Cassar *et al.*, 2017).

Devido à associação da infecção por HTLV-1 ao desenvolvimento de comorbidades graves como a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e a mielopatia associada ao HTLV/paraparesia espástica tropical (MAH/PET), são utilizados métodos para diagnóstico do estágio e risco de agravamento dessas doenças, normalmente por meio do estudo da carga pró-viral ou nível de proteínas específicas no líquido cefalorraquidiano. Novos estudos estão sendo realizados, visando tornar esse diagnóstico mais simples e eficaz, ao serem utilizadas amostras

de plasma de indivíduos infectados por HTLV-1 e portadores de ATLL ou MAH/PET para identificar novos marcadores para prever o risco da doença (Valentin *et al.*, 2001; Higuchi *et al.*, 2005; Kirk *et al.*, 2011; Ishihara *et al.*, 2015; Guerrero *et al.*, 2020).

1.3. Doenças associadas à infecção pelo HTLV-1

A identificação do HTLV-1 marcou a descoberta da primeira e única causa viral conhecida para a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL). A infecção por HTLV-1 está também associada ao desenvolvimento de doenças inflamatórias não-neoplásicas neurodegenerativas, em especial a mielopatia associada ao HTLV/paraparesia espástica tropical (MAH/PET) (Watanabe, 1997). Essas doenças, que apresentam alta morbidade e mortalidade, têm tratamento ainda limitado, o que afeta desfavoravelmente o prognóstico dos pacientes (Bangham *et al.*, 2015; Ishihara *et al.*, 2015; Pasquier *et al.*, 2018). Além disso, entre as outras doenças inflamatórias associadas à infecção por HTLV-1 estão a uveíte e dermatite infecciosa. A maioria dos indivíduos vivendo com o HTLV-1 permanece como portadores assintomáticos durante toda ou grande parte da vida (Watanabe, 1997; Bangham, 2000; Cook *et al.*, 2013). No entanto, se sugere que a infecção pelo HTLV-1 esteja associada a um aumento da susceptibilidade a infecções respiratórias, como tuberculose, ISTs, como sífilis, e hepatite C.

Os mecanismos exatos pelos quais o vírus promove o desenvolvimento dessas doenças não são completamente conhecidos, e também não se sabe por que essas doenças podem apresentar um longo período de latência. Aqui, serão discutidas algumas características conhecidas da MAH/PET.

MAH/PET, a mais comum manifestação neurológica associada ao HTLV-1, é uma mielopatia crônica lentamente progressiva, provocando, entre outras condições, fraqueza espástica de membros inferiores, que se agrava conforme há a evolução da doença. No início do processo de doença, as leptomeninges, vasos sanguíneos e parênquima da medula espinal são infiltrados com linfócitos T CD4⁺ CD8⁺, linfócitos B e macrófagos infectados por HTLV-1, iniciando o processo inflamatório no sistema nervoso central que resulta em lesões (Watanabe, 1997; Cook *et al.*, 2013). Mais tarde, há uma predominância de linfócitos T citotóxicos CD8⁺, cuja atividade (liberação de citocinas inflamatórias e citotoxicidade) promove a degeneração axonal e desmielinização (Fuzii *et al.*, 2014). As lesões causam

distúrbios motores, parestesia e neuropatias, distúrbios na bexiga e esfíncter intestinal, e disfunção erétil (Araujo e Silva, 2006; Izumo, 2010; Poetker *et al.*, 2011).

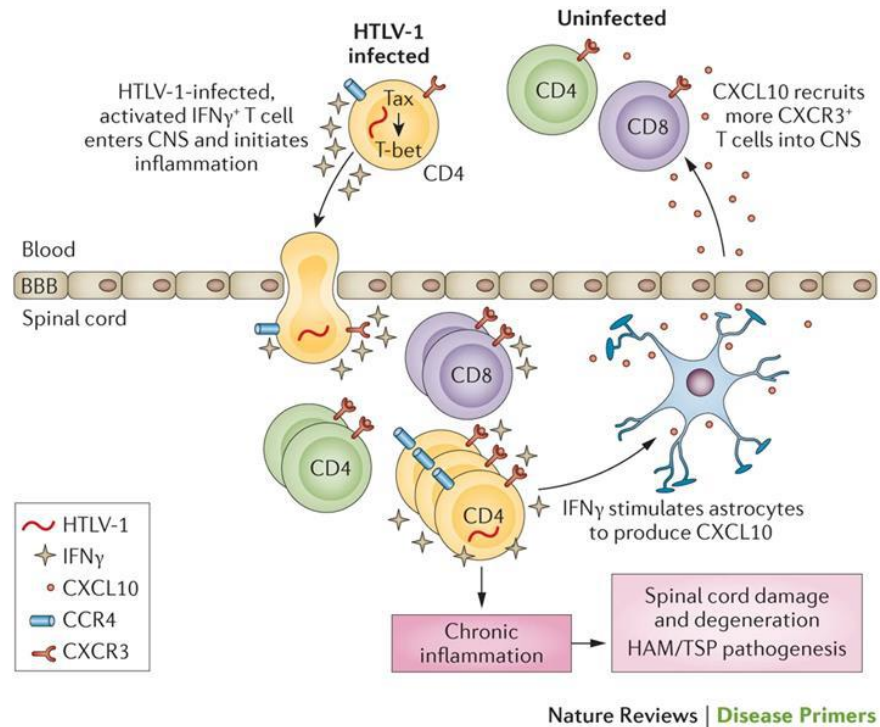


Figura 4 – Mecanismo sugerido de dano tecidual em MAH/PET. A expressão da proteína viral Tax ativa as células T infectadas, que atravessam a barreira hematoencefálica e adentram o sistema nervoso central. IFN γ secretado pelas células T infectadas estimula astrócitos a secretarem CXCL10, que recruta mais células T que expressam o receptor CXCR3, estabelecendo um foco de inflamação, que se auto propaga. Células T CD4 infectadas estão representadas em amarelo, e as não infectadas, em verde. As células T infectadas expressando Tax, tornam-se CCR4-positivas, receptor da quimiocina CCL22, e mais resistentes à morte (Bangham *et al.*, 2015).

1.4. Mediadores inflamatórios e a MAH/PET

É importante ressaltar que é sugerido que o desenvolvimento de lesão neurológica promova o aumento dos níveis de mediadores inflamatórios como IFN γ , TNF α , GM-CSF e IL-1 β (Tattermusch e Bangham, 2012). A presença de células ativadas e a liberação de citocinas promove a ativação da micróglia e a injúria neuronal. Alguns desses mediadores podem ser

detectados no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com MAH/PET, como por exemplo, IFN γ e IL-6 (Nishimoto *et al.*, 1990; Kuroda & Matsui, 1993; Nakamura *et al.*, 1993; Umehara *et al.*, 1994), metaloproteinase 9 (MMP-9; Giraudon *et al.*, 1997), as quimiocinas CXCL9 e CXCL10, e neopterinina (Sato *et al.*, 2013). A fim de elucidar a importância de estudos que correlacionam níveis de mediadores inflamatórios no plasma ou LCR à presença ou desenvolvimento de doenças relacionadas à infecção pelo HTLV-1, aqui serão citadas análises de diversas moléculas que já tiveram essa relação descrita.

Kirk e colaboradores (2011) demonstraram, através de análise proteômica do plasma de pacientes portadores da MAH/PET, níveis elevados de β 2-microglobulina e Calgranulina B quando comparado aos níveis encontrados no plasma de indivíduos assintomáticos (ACs) ou não infectados. Esses achados se correlacionaram positivamente com a gravidade apresentada pelos pacientes.

A Calgranulina B, também conhecida como S100A9 ou MRP14 (*myeloid-related protein 14*), é expressa, principalmente, em neutrófilos e em monócitos após a ativação da proteína quinase C. Em conjunto a Calgranulina A ela pode formar um heterodímero chamado Calprotectina, que tem papel central na sinalização de íons cálcio durante a inflamação. O contato com endotélio ativado induz a secreção de Calgranulina B por monócitos, enquanto que o contato com endotélio em estado de repouso suprime essa secreção. A concentração de Calgranulina B no soro está correlacionada com atividade de doença em condições inflamatórias como artrite reumatóide (Odink *et al.*, 1987), doença inflamatória intestinal (Rugtveit *et al.*, 1994) e inflamação crônica das vias aéreas (Roth *et al.*, 1992).

Estudos imunohistoquímicos prévios mostraram que a detecção de Calgranulina B indicaria atividade inflamatória ativa inicial das lesões em MAH/PET. Para Kirk e colaboradores (2011), os monócitos são ativados por contato com endotélio em pacientes com MAH/PET e seriam os responsáveis pelo aumento nos níveis da Calgranulina B no soro, sendo proposto o uso da proteína como biomarcador para a doença (Kirk *et al.*, 2011). Em indivíduos com esclerose múltipla, a Calgranulina B é expressa em macrófagos em lesões ativas iniciais, mas não lesões ativas tardias ou inativas (Abe *et al.*, 1999). Observou-se, a partir da análise de amostras de tecido de pacientes com MAH/PET, que a expressão de Calgranulina B só ocorria em lesões inflamatórias crônicas ativas (com lesões do parênquima com mudanças inflamatórias e degenerativas marcantes em ambos funículos laterais) de pacientes com a doença por um curto período (2,5 anos), estando quase ou completamente ausente em lesões crônicas inativas (com degeneração uniforme de ambos funículos laterais, e algumas células

inflamatórias nos espaços subaracnóideo e perivascular) de pacientes com a doença tardia (8 a 20 anos) (Abe *et al.*, 1999). Além disso, a expressão da Calgranulina B foi encontrada em macrófagos e células microgliais das regiões torácica e lombar da medula espinhal de pacientes com MAH/PET (Abe *et al.*, 1999).

Outra proteína alterada em indivíduos com MAH/PET, a β_2 -microglobulina (B2M), foi isolada primeiramente a partir da urina de pacientes com falência renal. Trata-se de uma proteína de baixo peso molecular (11.800 Da) encontrada na membrana plasmática da maior parte de células nucleadas, sendo componente invariável da cadeia leve do sistema de antígenos leucocitários humanos classe I (HLA-I) (Peterson *et al.*, 1972; Poulik *et al.*, 1979). A B2M é ligada não-covalentemente à cadeia pesada de HLA, e é essencial para sua especificidade sorológica. Sob circunstâncias normais de filtração renal, níveis elevados de B2M sérica indicam alta produção ou liberação de B2M. A ativação do sistema imune leva a liberação de B2M à circulação por linfócitos T e B, e a proteína é mais tarde eliminada por filtração glomerular e reabsorção tubular (Schardijn e van Eps, 1987). Por estar presente na maior parte das células nucleadas e ser quase totalmente absorvida e catabolizada pelo túbulo proximal, a B2M serve como indicador de ativação imune e função do túbulo proximal (Wu, 2006).

Desde a década de 1970, pesquisadores demonstraram interesse em avaliar os níveis de B2M na urina de pacientes transplantados renais e portadores de leucemia. Nilsson e seus colaboradores (1974) concluíram que culturas celulares derivadas de tecidos tumorais produziam B2M em maior quantidade comparada aos níveis encontrados em células de origens diferentes. Entretanto, células derivadas de linfoma de Hodgkin secretam menos B2M do que células de origem hematopoiética normais. A determinação de B2M no soro e urina também foi utilizada experimentalmente para diagnóstico de disfunção renal em neonatos após asfixia perinatal (Fernandez *et al.*, 1989). Recentemente, o estudo de B2M sérica foi utilizado para analisar o prognóstico de pacientes com linfoma não-Hodgkin (Wu *et al.*, 2014). Atualmente, a concentração de B2M no soro é utilizada como marcador de doença renal crônica, e como uma medida de atividade e progressão de algumas doenças neoplásicas (mieloma múltiplo, leucemia, linfoma) (Pagana e Pagana, 2007; Wu, 2006) ou infecção por HIV-1 (Boffa, 1994). Também foi vista eficiência na utilização de B2M como marcador prognóstico em linfoma de células T angioimunoblástico (Shang *et al.*, 2018). Muitas neoplasias, como carcinoma colorretal, melanoma e carcinoma cervical, apresentam falha na expressão de HLA-I na superfície celular, que pode ser causada por mutações em B2M, levando ao escape do reconhecimento imune por CTLs (Garrido *et al.*, 2010; Hicklin *et al.*, 1998). Essa associação foi observada e confirmada

por Challa-Malladi e colaboradores em 2011, durante estudo de linfoma difuso de grandes células B.

Sadamori (1995) estudou a utilidade de marcadores séricos como indicadores de atividade da doença em pacientes com ATLL, e encontrou relação entre a doença e o nível de B2M. Níveis séricos de B2M também foram utilizados por Zhang e colaboradores (2005) para monitoramento do avanço da doença em estudo de terapia para ATLL. Foi notado que o aumento na concentração de B2M no plasma de pacientes com MAH/PET estava fortemente correlacionado com redução da capacidade motora (análise do tempo que os pacientes levavam para atravessar a pé uma distância de 10 metros), causada pelo avanço da doença (Kirk *et al.*, 2011). Sob análise comparativa realizada entre amostras de sangue de grupos de indivíduos vivendo com HTLV-1 portadores de ATLL, ou MAH/PET, e não infectados, foi notado que, entre todos os grupos analisados, os valores de B2M eram maiores para as amostras de pacientes com ATLL (Giusti *et al.*, 1996). Sugere-se que tanto para pacientes com MAH/PET quanto com HIV-1 e HIV-2, é provável que uma concentração elevada de B2M no soro seja resultado da ativação crônica de um grande número de linfócitos T (Kirk *et al.*, 2011).

Os receptores do fator de necrose tumoral 1 (TNFR-1/CD120a) e 2 (TNFR-2/CD120b), assim como o TNFRSF8 (ou CD30), são receptores pertencentes à superfamília TNF encontrados ancorados à membrana celular, também podendo ser encontrados na sua forma solúvel. Quando ativados por ligação a citocinas TNF-like como TNF- α e linfotóxina alfa, eles exercem papel na regulação da proliferação, migração, diferenciação e sobrevivência de células-alvo. Segundo Guerrero e seus colaboradores (2020), indivíduos vivendo com HTLV-assintomáticos, ou portadores da ATLL (dos tipos aguda, linfomatoso, indolente e crônica) não tratados ou em remissão apresentam diferentes concentrações, entre esses grupos, de sTNFRs no plasma. Nesse estudo foi notado um aumento nas concentrações de sTNFR1, sTNFR2 e sTNFRSF8 (CD30s) no plasma dos pacientes com ATLL em comparação com pacientes assintomáticos. Expressão elevada de sTNFR2 e sTNFR1 foi observada, especialmente, em pacientes com ATLL aguda quando comparados com os indivíduos assintomáticos. Para CD30s, foi encontrado aumento no plasma de pacientes com ATLL aguda e crônica em comparação a portadores assintomáticos. Entretanto, os níveis de sTNFR2 e CD30s em pacientes assintomáticos e com ATLL em remissão eram semelhantes (Guerrero *et al.*, 2020). A expressão elevada de CD30 contribui para a ativação constitutiva de NF- κ B, que por sua vez é capaz de ativar Tax1, induzindo a proliferação desregulada de células infectadas por HTLV-1 e contribuindo para a evolução do quadro de ATLL (Higuchi *et al.*, 2005). Desta forma, esses

achados sugerem que o CD30s poderia ser utilizado como biomarcador para ATLL a partir de amostras de pacientes vivendo com HTLV-1. Além disso, Nishimura e seus colaboradores demonstraram a presença de um polimorfismo no gene do TNFR2 em pacientes vivendo com HTLV-1. Esse achado foi correlacionado com o aumento da suscetibilidade para o desenvolvimento de MAH/PET (Nishimura *et al.*, 2000).

A SPARC (do inglês *secreted protein acidic and rich in cysteine*), também chamada de osteonectina, é uma proteína matriz celular ligante de colágeno, sendo necessária para que o colágeno dos ossos se torne calcificado. Entretanto, essa proteína pode influenciar em outras funções biológicas, como a síntese e remodelação da matriz extracelular e supressão tumoral. SPARC é encontrada em maiores quantidades no compartimento extracelular, sendo expressa em níveis significantes no SNC (em especial, por células gliais) de adultos. Em estudo realizado por Ishihara e colaboradores (2015), utilizando amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e de plasma de pacientes vivendo com HTLV-1 assintomáticos ou com MAH/PET, indicou que os níveis de SPARC tanto no LCR quanto no plasma encontram-se reduzidos em pacientes com MAH/PET. Segundo os autores, há uma correlação entre essa diminuição e a redução do número de células gliais, provocada pela degeneração gradual da medula espinhal vista em pacientes com essa condição (Ishihara *et al.*, 2015). Entretanto, Ohyashiki e seus colaboradores (2008) sugerem em seu trabalho que a SPARC, em ATLL, exerce nas células um papel importante na proliferação celular e a sua ausência promove o aumento da susceptibilidade das células à morte celular.

A apolipoproteína A-II (ApoA-II) é o segundo componente mais abundante de HDL. O papel de ApoA-II em processos inflamatórios foi observado por Thompson e colaboradores (2008), que relataram a influência da ApoA-II no processo no qual HDL aumenta a resposta de monócitos ao lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano por meio da supressão da atividade inibitória de altas concentrações de LBP (proteína ligadora de LPS). Anteriormente, em estudo realizado com camundongos transgênicos super expressando ApoA-II, foi demonstrado que o HDL era convertido em partículas pró-inflamatórias capazes de induzir a transmigração de monócitos pela parede arterial. Esse fenômeno foi associado a um aumento no desenvolvimento de lesões ateroscleróticas (Castelanni *et al.*, 1997). A partir da análise por SELDI-TOF-MS (*surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) de amostras de plasma de pacientes HTLV-1 positivos com MAH/PET ou assintomáticos foi identificada a presença de um alto pico de ApoA-II associado aos indivíduos assintomáticos (Kirk *et al.*, 2011).

A molécula de adesão celular vascular-1 (*Vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM1), também conhecida como CD106 ou VCAM-110, é uma molécula de adesão endotelial membro da superfamília de imunoglobulinas, expressa em células endoteliais ativadas após exposição a citocinas inflamatórias. Ela medeia o rolamento e adesão de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos recrutados ao endotélio vascular, a partir da interação com a beta-1 integrina VLA-4 (Iademarco *et al.*, 1992). A infecção por HTLV-1 regula positivamente a expressão de VLA-4 em linfócitos (Dhawan *et al.*, 1993). VCAM-1 pode mediar a formação de sincícios induzida por HTLV-1, servindo como uma molécula acessória ou potencial correceptor para fusão celular induzida por HTLV-1, sendo levantada a hipótese de que VCAM-1 serviria como receptor para o vírus (Hildreth *et al.*, 1997).

Seu papel no recrutamento leucocitário justifica seu uso no monitoramento do sistema imunológico em diversas doenças (Schlesinger e Bendas, 2015). Moléculas de adesão celular solúveis (CAMs) resultam de *splicing* alternativo do mRNA ou proteólise da proteína ligada a membrana (Navarro-Hernández *et al.*, 2009). Níveis elevados de CAMs, inclusive VCAM-1, são encontrados em pacientes com infecções, câncer, doenças inflamatórias e autoimunes, como consequência da ativação endotelial, e em alguns casos têm valor como marcador prognóstico ou diagnóstico para estas doenças (Meager *et al.*, 1996; Navarro-Hernández *et al.*, 2009).

A alta concentração de VCAM-1s foi identificada como indicador da progressão da doença e de previsão de mortalidade em sangue periférico e pulmão de pacientes com fibrose pulmonar idiopática (Richards *et al.*, 2012; Agassandian *et al.*, 2015). Também foi documentado que a expressão aumentada de VCAM-1s em hemorragia intracerebral pode estar relacionada a processos fisiológicos e patológicos da condição, com envolvimento de VCAM-1 na apoptose neuronal, que sucede a hemorragia intracerebral em modelo de estudo animal usando ratos adultos (Zhang *et al.*, 2015). O papel de VCAM-1s na patogênese, e a consequente presença de altas concentrações da molécula no sangue, também foi visto em artrite reumatoide, estando relacionado a sua função na resposta inflamatória (Navarro-Hernández *et al.*, 2009). Altos níveis de VCAM-1s em amostras de endométrio e soro de pacientes com endometriose, em comparação a controles sem endometriose, também demonstraram o potencial de VCAM-1s para o diagnóstico dessa doença (Kuessel *et al.*, 2017).

Ligantes de superfície endotelial como VCAM-1 também podem estar envolvidos na metástase de células tumorais (Iademarco *et al.*, 1992). Em análise visando medir os níveis de

VCAM-1s e outras moléculas de adesão vascular em pacientes com câncer de bexiga, mama, gastrointestinal, de ovário, renal, linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin e mieloma, as concentrações de VCAM-1s estavam elevadas no sangue de pacientes com todos os tipos de câncer estudados quando comparadas aos controles (Banks *et al.*, 1993). Outras análises *in vitro* posteriores a identificação da molécula confirmaram o papel de VCAM-1 na adesão de células tumorais como melanomas, osteosarcomas, carcinomas de células renais, leucemias e linfomas (Taichman *et al.*, 1991; Juneja *et al.*, 1993).

No contexto da infecção pelo HTLV-1, foi observada a indução de VCAM-1 pela proteína viral Tax em linfócitos T infectados. Nessas células a VCAM-1 é capaz de promover a adesão célula-célula, contribuindo para a proliferação (Valentin *et al.*, 2001). Em estudo com amostras de sangue de 34 pacientes com HTLV-1, dos quais 17 tinham ATLL e outros 17 eram assintomáticos, não foi encontrada diferença significativa nos níveis de expressão de VCAM-1 entre os dois grupos (Jafarian *et al.*, 2017).

Ishihara e colaboradores (2015), em estudo comparativo com amostras de LCR e plasma de pacientes com HTLV-1 separados em assintomáticos e portadores de MAH/PET, identificaram que VCAM-1s está regulada positivamente na região inflamatória na medula espinhal de pacientes com MAH/PET. Essa correlação entre a maior expressão de VCAM-1s e pacientes com MAH/PET também foi observada ao serem analisadas as amostras de plasma. A concentração de neopterin no LCR é um dos marcadores utilizados atualmente para medir a gravidade em MAH/PET, mas não é capaz de descrever especificamente a degeneração da medula espinhal vista na doença, apresentando altas concentrações em uma diversidade de doenças neurológicas, além de requerer um procedimento invasivo para a retirada de amostras. Em contrapartida, VCAM-1s tem características mais distintivas para PET/MAH que neopterin, além da possibilidade de medição através de amostras de plasma (Ishihara *et al.*, 2015). A concentração de VCAM-1s no plasma como marcador para o estabelecimento e gravidade da doença pode contribuir para o diagnóstico ágil e menos invasivo de PET/MAH, que é essencial para o controle da doença, especialmente em seus estágios iniciais.

CXCL10 (C-X-C Motif Chemokine Ligand 10), também conhecida como IP-10, faz parte de um subgrupo de quimiocinas CXC não-ELR que regulam a migração de linfócitos T efetores Th1-polarizados aos sítios de inflamação durante a resposta imune adaptativa (Murphy, 2003). CXCL10 atua através da ligação ao receptor CXCR3, e sua indução depende predominantemente da região c-terminal desse receptor. CXCL10 é capaz de promover

atividade quimiotática de células CXCR3+, induzindo apoptose, regulando o crescimento celular e proliferação, assim como angiogênese em doenças infecciosas e inflamatórias e câncer (Liu *et al.*, 2011). CXCL10 é considerada um marcador para lesões inflamatórias crônicas, e é tida como uma das principais moléculas envolvidas na patogênese de MAH/PET. Foi constatada a presença abundante de CXCL10 no LCR de pacientes com MAH/PET, e essa concentração foi correlacionada com o grau de avanço da doença (Nomoto *et al.*, 1991; Narikawa *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2013). CXCL10 produzido por astrócitos na medula espinhal de pacientes MAH/PET recruta células CXCR3+ à medula espinhal (Tamaki *et al.*, 2019). Como mencionado anteriormente, IFN γ secretado por linfócitos T infectados por HTLV-1 estimula a secreção de CXCL10 pelos astrócitos, recrutando mais linfócitos T que expressam o receptor CXCR3, estabelecendo um foco de inflamação que se auto propaga, e levando a lesão (Bangham *et al.*, 2015). Sato e colaboradores (2018) constataram uma correlação entre níveis elevados de CXCL10 no LCR e atividade elevada da doença, que levava a um pior prognóstico desses pacientes. Ainda há, porém, uma escassez de estudos sobre a análise de CXCL10 no plasma de pacientes com doenças associadas à infecção por HTLV-1.

A D-aminoácido oxidase (DAO ou DAAO) é uma enzima que catalisa a desaminação oxidativa dependente de dinucleótido de flavina e adenina (FAD) de D-aminoácidos (grupo amino à direita segundo a projeção de Fisher). Devido à alta seletividade por isômeros D, a enzima é responsável pela manutenção dos níveis de D-aminoácidos no organismo. Em mamíferos, DAO está presente em regiões como rins, fígado, e, mais abundantemente, no cérebro e medula espinhal. A enzima tem papel descrito em uma diversidade de funções, que incluem a regulação da secreção de hormônios, da hipertensão arterial, do aprendizado e da memória (Pollegioni *et al.*, 2007; Khoronenkova e Tishkov, 2008). DAO já foi relacionada a processos fisiopatológicos em algumas doenças do sistema nervoso central, como, por exemplo, na esquizofrenia (Papagni *et al.*, 2011), na doença de Alzheimer (Fisher *et al.*, 1991 e 1998) e na doença de Parkinson (Kawazoe *et al.*, 2007). DAO é responsável pela degradação de D-serina, co-agonista dos receptores N-metil D-aspartato (NMDARs), que por sua vez tiveram relação sugerida em mecanismos de neurodegeneração em estudo sobre esclerose lateral amiotrófica (Kondori *et al.*, 2018). MAH/PET também é uma doença neurodegenerativa do sistema nervoso central, mas análises de DAO em indivíduos com essa condição não haviam sido descritas anteriormente.

Metaloproteinases de matriz (MMPs), como a MMP-2, são importantes em processos fisiológicos normais e também podem contribuir em processos patológicos associados à

degradação descontrolada de tecido, tendo envolvimento na regulação da composição da matriz extracelular e interação célula-célula via integrinas. A regulação de MMPs depende da atuação de inibidores de metaloproteinase, TIMPs. Um estudo envolvendo células gliais de camundongos co-cultivadas com linfócitos T infectados por HTLV-1 revelou que a expressão de MMPs e TIMPs em células gliais infectadas poderia ser desbalanceada, devido a alterações na expressão de TNF- α e IL-1 α induzidas pela infecção (Giraudon *et al.*, 1997). Estando envolvidas na regulação da composição da matriz extracelular e na interação célula-célula, alterações no balanço de MMPs e TIMPs pode levar a um descontrole em ambas as funções, alterando a homeostase do sistema nervoso central e potencialmente atuando na patogênese de MAH/PET. Estudos sobre concentrações de MMP-2 no plasma de indivíduos com HTLV-1 não haviam sido realizados até o presente.

Nitrito (NO₂⁻), bem como nitrato (NO₃⁻), é um produto oxidativo do metabolismo de óxido nítrico (NO), e, portanto, sua presença depende da produção de NO (Giustarini *et al.*, 2008). NO media muitas funções fisiológicas (sendo necessário, por exemplo, para manter a resposta vascular adequada ao aumento da necessidade de circulação de sangue durante exercício), mas tem curta meia-vida na presença de outras moléculas. Assim, a quantificação de nitrito no plasma costuma ser realizada como indicador da atividade de NO no organismo. Os níveis de nitrito são capazes de refletir mudanças agudas na atividade de óxido nítrico-sintase (NOS) (Kleinbongard *et al.*, 2006). A atividade elevada de NOS teve papel como mediador em neuroinflamações reportado em doenças neurológicas, como a esclerose múltipla (Ljubisavljevic *et al.*, 2014), mas há uma carência de estudos sobre seus possíveis papéis em MAH/PET.

2. JUSTIFICATIVA

No intuito de melhorar o entendimento do surgimento e da progressão de doenças neurológicas, a detecção de algumas proteínas vem sendo estudada tanto no plasma quanto no LCR. Como já mencionado, proteínas como a Calgranulina B, B2M, SPARC, sTNFRs, ApoA-II, VCAM-1 e CXCL10 vêm sendo analisadas como potenciais biomarcadores para doenças associadas à infecção por HTLV-1. Atualmente, a carga pró-viral, normalmente medida a partir de PBMC, é o principal parâmetro para análise do risco de desenvolvimento de doenças relacionadas ao HTLV-1, em especial para MAH/PET, mas este dado muitas vezes se sobrepõe entre indivíduos assintomáticos e aqueles que desenvolveram quadros de doença. A busca e

análise de biomarcadores específicos se mostra, então, necessária para garantir agilidade e precisão no monitoramento do desenvolvimento e avanço dessas doenças, contribuindo para o favorecimento do prognóstico de pacientes afetados. Além disso, a falta de disponibilidade de vacinas, a dificuldade no tratamento e a gravidade dos quadros associados à infecção, torna evidente a necessidade de maiores estudos sobre os mecanismos envolvidos na patogênese e possíveis marcadores para um tratamento mais eficaz.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O estudo a ser realizado tem como objetivo analisar, a partir de amostras de plasma de pacientes vivendo com HTLV-1 portadores de MAH/PET ou assintomáticos, e indivíduos não infectados pelo HTLV-1, substâncias com potencial para auxílio na identificação do avanço da doença neurológica.

3.2. Objetivos específicos

- Detectar os níveis de DAO no plasma de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (ACs e MAH/PET) e não infectados;
- Avaliar os níveis de CXCL10, IL-6 e MMP-2 no plasma de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (ACs e MAH/PET) e não infectados;
- Analisar os níveis da enzima lactato desidrogenase (LDH) no plasma de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (ACs e MAH/PET) e não infectados;
- Dosar o nível de proteínas totais no plasma de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (ACs e MAH/PET) e não infectados;
- Analisar os níveis de nitrito no plasma de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (ACs e MAH/PET);
- Correlacionar os dados obtidos com o grau de incapacidade motora estabelecido pela escala IPEC2 e com a carga pró-viral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. População estudada e obtenção de amostras

Estudo experimental de *coorte* exploratório, analisada parte da coorte do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da FIOCRUZ, aprovado pelo comitê de ética sob número CAAE: 46962821.1.0000.5262. Todos os indivíduos incluídos no presente estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram incluídos no estudo indivíduos de ambos os sexos, maiores de 18 anos, portadores de infecção pelo HTLV-1, e que concordaram em participar do estudo e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. Desta forma, o estudo foi baseado nos seguintes grupos:

- (1) Indivíduos vivendo com HTLV-1 assintomáticos (n=10)
- (2) Indivíduos vivendo com HTLV-1 portadores de MAH/PET (n=26)
- (3) Indivíduos não infectados pelo HTLV-1 saudáveis pareados em idade e sexo com os indivíduos dos demais grupos (n=11)

Os pacientes foram avaliados por um neurologista e os dados registrados no protocolo de acompanhamento clínico utilizado pelo Centro de Referência em HTLV. Na avaliação clínica foi analisado o desenvolvimento de doença associada ao HTLV-1 e a progressão MAH/PET, indicada pela escala IPEC-2 (em anexo). As amostras de plasma foram obtidas a partir de sangue coletado em tubo com EDTA, separadas por centrifugação (1000 g/10 minutos) e mantidas a -20 °C até o momento do uso.

Os dados clínicos e laboratoriais dos indivíduos infectados por HTLV-1 foram extraídos do sistema de prontuários eletrônicos do INI/FIOCRUZ, mantendo-se a confidencialidade e privacidade. O diagnóstico de HAM/TSP foi realizado por neurologistas do Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções (LAPCLIN-NEURO) do INI conforme critérios da Organização Mundial de Saúde (Bangham *et al.*, 2015).

4.2. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de D-aminoácido Oxidase (DAO)

A detecção de DAO em amostras de plasma foi realizada por ELISA, seguindo as especificações do fabricante (*ELISA Kit for D-Amino Acid Oxidase*; Cloud-Clone Corp., Katy,

TX, EUA). Anterior à realização do ensaio, os componentes foram reconstituídos, a curva padrão foi preparada (1,56 -100 ng/mL), assim como os reagentes de detecção, e as amostras foram diluídas 20 vezes, seguindo a orientação do fabricante. O experimento foi realizado, em placa de 96 poços pré-sensibilizada, pronta para uso, com a adição de 100 µL nos poços da curva, branco e amostras. Após 1h a 37°C de incubação, líquido foi removido e em seguida, 100 µL do reagente de detecção A, previamente preparado, foram adicionados aos poços. Após 1h a 37°C de incubação foram realizadas 3 lavagens com 350 µL da solução de lavagem. Em seguida, foram adicionados 100 µL do reagente de detecção B, previamente preparado. Após 30 minutos a 37°C de incubação, foram realizadas 5 lavagens nas mesmas condições. Foram adicionados 90 µL da solução de substrato (3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina, TMB) à placa. Após 10 minutos a 37°C de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de *Stop Solution* (fornecida pelo kit). A leitura foi realizada imediatamente em espectrofotômetro de microplacas (*SpectraMax*®, Molecular Devices, CA, EUA) no comprimento de onda de 450 nm.

4.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de CXCL10, IL-6 e MMP-2

As detecções de CXCL10 e IL-6 foram realizadas através de ELISA, segundo protocolo do fabricante (*Human IP-10 e Human IL-6 Standard TMB ELISA Development Kit*; PeproTech, Cranbury, NJ, EUA). Placas de 96 poços independentes foram preparadas com 50 µL de anticorpo de captura anti-CXCL10 humano ou anti-IL-6 humano diluídos em PBS na concentração de 0,25 µg/mL e 0,5 µg/mL, respectivamente. As placas foram incubadas *overnight* a 4°C, em seguida, foram realizados 4 ciclos de lavagem com PBS + Tween-20 0,05% (Sigma-Aldrich). Ambas as placas receberam uma solução de bloqueio (PBS + + 1% de albumina bovina - BSA; Sigma-Aldrich) e foram incubadas por 1h à temperatura ambiente. Previamente, as amostras de plasma foram descongeladas e diluídas 1:4 em PBS + BSA 1%. Também foram preparadas as curvas padrão de CXCL10 e IL-6 nas concentrações de 3,9 a 250 pg/mL e 2000 pg/mL, respectivamente. Após o bloqueio as placas foram submetidas a 4 ciclos de lavagem, para em seguida receberem as amostras e curva padrão (50 µL). Após 2h à temperatura ambiente, foram realizados 4 ciclos de lavagem. Logo após, foram adicionados 50 µL dos anticorpos de detecção biotinizados, numa concentração de 0,50 µg/mL (CXCL10) e 0,1 µg/mL (IL-6). Após 2h à temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas 4 vezes. Em seguida, foram adicionados 50 µL/poço de conjugado Estreptavidina-HRP (*horseradish peroxidase*) (R&D; diluído em PBS + BSA 1%, 1:40 v/v). A placa foi incubada em temperatura ambiente por 30 minutos, seguido de 4 ciclos de lavagem. Posteriormente, 50 µL/poço de

substrato 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB; R&D) foram adicionados. Ao final de 10 a 20 minutos, foi adicionada solução de parada (HCl 1M) e, imediatamente, as placas foram lidas em um espectrofotômetro de microplacas no comprimento de onda de 450 nm com correção a 620 nm.

Para a detecção de MMP-2, foi realizado ELISA conforme protocolo do fabricante (*Total MMP-2 Quantikine ELISA Kit*; R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Para tal, foram primeiramente preparados os reagentes, curva e amostras (diluídas 1:20). Em placa de 96 poços pré-sensibilizada com anticorpo específico para MMP-2, foram adicionados 50 µL de diluente (fornecido pelo kit). Foram então adicionados 50 µL da curva padrão e amostras. Após 2h a temperatura ambiente sob agitação, foram realizados 4 ciclos de lavagem com 200 µL de solução de lavagem (fornecida pelo kit). Em seguida, foram adicionados 200 µL de anticorpo de detecção à placa. Após 2h à temperatura ambiente sob agitação, foram realizados mais 4 ciclos de lavagem. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de substrato à placa, que foi então incubada durante 30 minutos protegida da luz. Ao final, foi adicionada solução de parada e a placa foi lida em um espectrofotômetro de microplacas no comprimento de onda de 450 nm com correção a 570 nm.

4.4 Análise da atividade da Lactato Desidrogenase (LDH)

A lactato desidrogenase é uma enzima que participa de processos como a geração de energia em células animais. Ela catalisa a oxidação reversível do lactato para piruvato, tendo o NAD⁺ como cofator e encontra-se presente nas mais variadas células do corpo. A dosagem de LDH foi realizada segundo protocolo do fabricante do kit (*CyQUANT™ LDH Cytotoxicity Assay Kit*; Invitrogen/Thermo Fisher, Eugene, OR, EUA). Para tal, 25 µL da solução de mista (substrato + solução tampão, ambos fornecidos pelo kit) foram misturados com 25 µL de cada amostra ou de controle positivo (fornecido pelo kit), e incubados em temperatura ambiente por 30 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, foram adicionados 25 µL de solução de parada. A absorbância foi lida em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 490 nm e 680 nm.

4.5. Análise de proteínas totais

Os níveis de proteínas totais no plasma foram avaliados por fluorimetria, utilizando o equipamento e kit *Qubit™ Protein Assay* (Invitrogen/Thermo Fisher). Para tal, foram preparados tubos contendo 20 µL de cada uma das amostras, aos quais foram adicionados 150 µL de *Qubit™ Protein Buffer*. A esses tubos, foram então adicionados 30 µL de *Qubit™ Protein Reagent* diluído anteriormente. Após mistura em vórtex por 5 segundos, os tubos foram inseridos para leitura em fluorômetro *Qubit™* previamente calibrado.

4.6. Análise dos níveis de Nitrito

A produção de óxido nítrico foi mensurada através da análise dos níveis de nitrito, utilizando o método de Griess (Green et al., 1982). Para tal, foi preparada uma curva de nitrito de sódio (Sigma-Aldrich; 3,125 - 100 µM) em tampão salina-fosfato (PBS). 50 µL de amostras ou nitrito de sódio foram adicionados e misturados a 50 µL de solução de Griess (Sigma-Aldrich) em uma placa de 96 poços. Após 15 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

4.7. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 8. As variáveis quantitativas foram avaliadas quanto à distribuição normal de valores com o teste de Kolmogorov Smirnov. As variáveis com dispersão normal foram avaliadas por testes paramétricos (teste t de Student), e as variáveis assimétricas foram avaliadas por testes não-paramétricos (MannWhitney, Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunns). Os números e percentuais de células foram apresentados como mediana e intervalo interquartilico 25%-75% (IQ25-75). O grau de incapacidade de pacientes com MAH/PET foi avaliado pela escala IPEC-2 (**Anexo**) e seus valores foram apresentados em função do tempo de doença (em anos). Os dados referentes a escala IPEC-2 e a carga pró-viral foram retirados do banco de dados do INI. A correlação entre estas variáveis foi calculada pelo teste de Spearman, e foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Análise dos níveis de proteínas totais no plasma

Os níveis totais de proteínas no soro são normalmente ditados pela síntese proteica no fígado, e podem indicar condições de nutrição do paciente, ou ajudar no diagnóstico de determinadas doenças (em especial aquelas que envolvem lesões no fígado) (Dufor *et al.*, 2000). Na **Figura 5** observamos que os grupos estudados, NI, A e MAH, apresentaram níveis semelhantes de proteínas totais no plasma, com medianas de 2,085, 2,270 e 2,270 (g/dL), respectivamente. Não foi vista relação entre os níveis de proteínas totais no plasma e a presença de infecção por HTLV-1, ou ainda o desenvolvimento de MAH/PET.

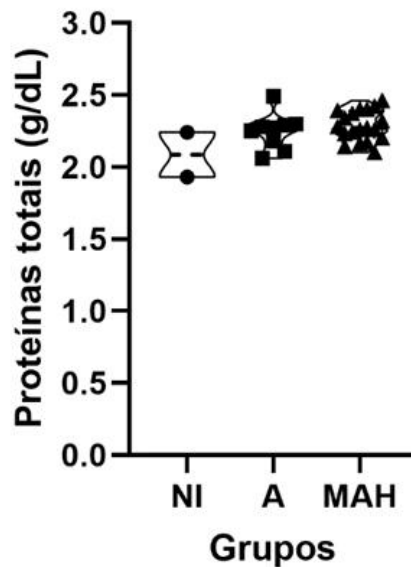


Figura 5 – Níveis de proteínas totais (g/dL) no plasma. Foram analisadas amostras de indivíduos não infectados (NI), pessoas vivendo com HTLV-1 assintomáticas (A) e portadores de MAH/PET (MAH). Os dados referentes aos níveis de proteínas totais (g/dL) de 30 amostras de plasma (NI, n=2; A, n=9; MAH, n=19) oriundas do INI/FIOCRUZ, obtidos através da análise das amostras de plasma por fluorimetria utilizando equipamento e kit Quibit™. Cada ponto identifica um indivíduo diferente.

5.2. Comparação entre os níveis de DAO

Nossos resultados indicam que não há diferença significativa entre os níveis de DAO no plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1 assintomáticos (mediana = 69,66 ng/mL) e aqueles portadores de MAH/PET (mediana = 75,40 ng/mL). Entretanto, podemos sugerir que esses pacientes apresentem um aumento nos níveis de DAO, pois segundo outros trabalhos que utilizaram o mesmo kit para mensurar a enzima no plasma, indivíduos saudáveis têm níveis de DAO em torno de 23.9 ± 11.2 ng/mL (Lin *et al.*, 2017).

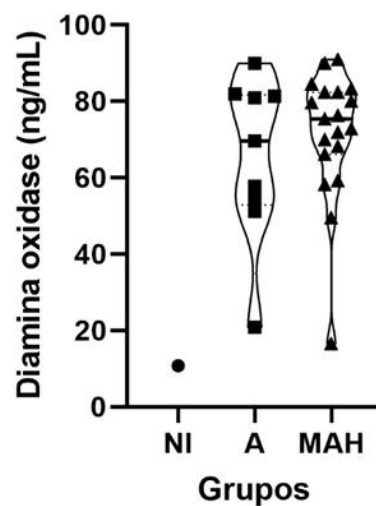


Figura 6 – Detecção dos níveis de DAO no plasma de indivíduos não infectados (NI), com HTLV-1 assintomáticos (A) e portadores de MAH/PET (MAH). Os resultados obtidos de amostras de plasma (NI, n=1; A, n=9; MAH, n=19), oriundas de pacientes do INI/FIOCRUZ. Detecção da DAO (ng/mL) realizada por ELISA segundo as orientações do fabricante. Cada ponto identifica um indivíduo diferente.

5.3. Níveis plasmáticos de CXCL10 e IL-6 em pessoas vivendo com HTLV-1

Durante o presente estudo, foi observada diferença significativa entre os níveis de CXCL10 no plasma de indivíduos não infectados (mediana = 65,87 pg/mL) quando comparados aos níveis encontrados tanto em pessoas vivendo com HTLV-1 assintomáticas (mediana = 195,2 pg/mL) quanto portadores de MAH/PET (mediana = 186,1pg/mL). Além disso, foi vista

correlação entre os níveis de CXCL10 e os níveis de DAO encontrados durante o presente estudo, com uma tendência de maiores níveis de DAO sendo encontrados em indivíduos com menores concentrações de CXCL10 no plasma (**Figura 7**).

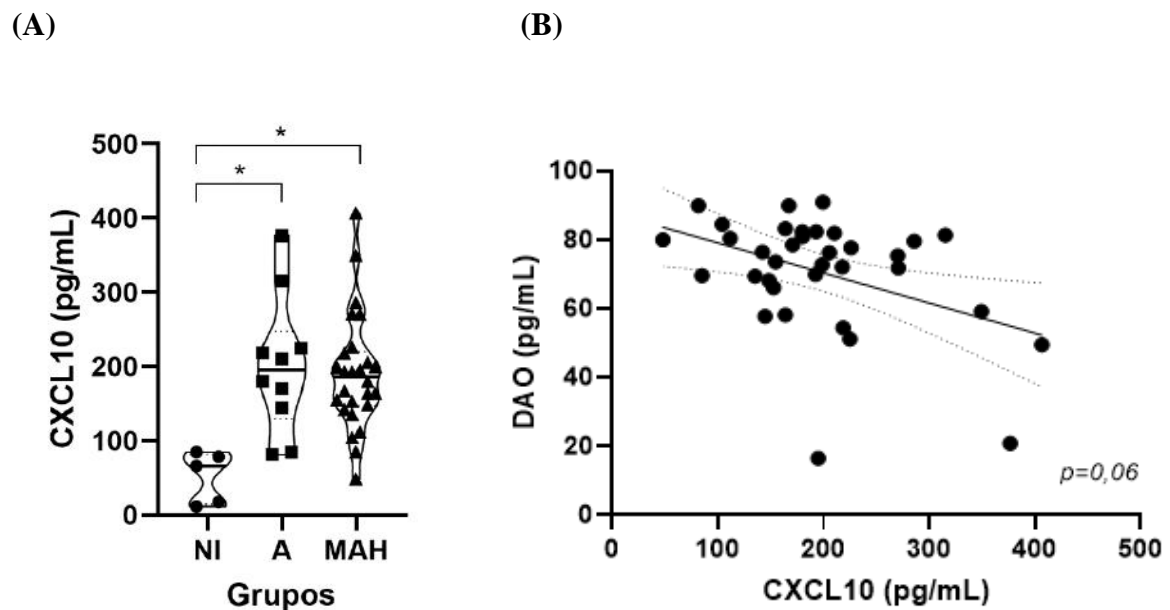


Figura 7 – Alteração dos níveis de CXCL10 no plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1. (A) Dados da detecção de CXCL10 (pg/mL) em amostras de plasma de indivíduos não infectados (NI, n=5), pessoas vivendo com HTLV-1 assintomáticas (A, n=10) e portadores de MAH/PET (MAH, n=26). Detecção de CXCL10 realizada por ELISA segundo as orientações do fabricante. *p<0,05 diferença entre os grupos considerada significativamente. (B) Análise de correlação de Spearman entre os níveis de DAO e CXCL10 no plasma de indivíduos com HTLV-1. Cada ponto identifica um indivíduo diferente.

IL-6 é uma citocina pró-inflamatória com ação pleiotrópica, e, quando presente em níveis desregulados, está associada a inflamação crônica (Kaplanski *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2020). Durante a análise de IL-6 no plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1 realizada no presente estudo, não foi encontrada diferença significativa entre os níveis de IL-6 no plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1 assintomáticos (mediana = 201,9 pg/mL) e aqueles portadores de MAH/PET (mediana = 210,8 pg/mL, **Figura 8**).

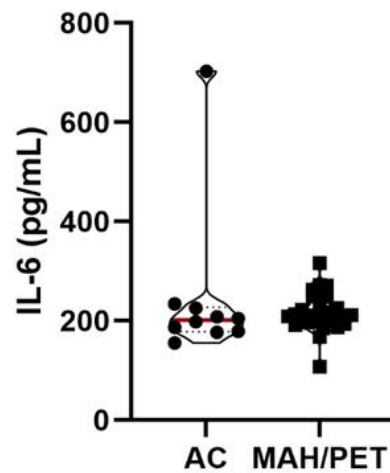


Figura 8 – Detecção de IL-6 no plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1. Dados da detecção de IL-6 (pg/mL) em amostras de plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1 assintomáticos (A; n=10) e portadores de MAH/PET (MAH; n=26). Detecção de IL-6 realizada por ELISA segundo as orientações do fabricante. Cada ponto identifica um indivíduo diferente.

5.4. Níveis plasmáticos de MMP-2 em pessoas vivendo com HTLV-1

Durante análise dos níveis de MMP-2 no plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1, não foi observada diferença significativa entre os níveis de MMP-2 no plasma de pacientes com HTLV-1 assintomáticos (mediana = 190,3 ng/mL) e aqueles portadores de MAH/PET (mediana = 192,8ng/mL). Porém, foi encontrada uma tendência de correlação negativa entre os níveis plasmáticos de MMP-2 e a escala IPEC2, ou seja, foram encontrados níveis mais altos de MMP2 no plasma de pacientes com menor incapacidade motora.

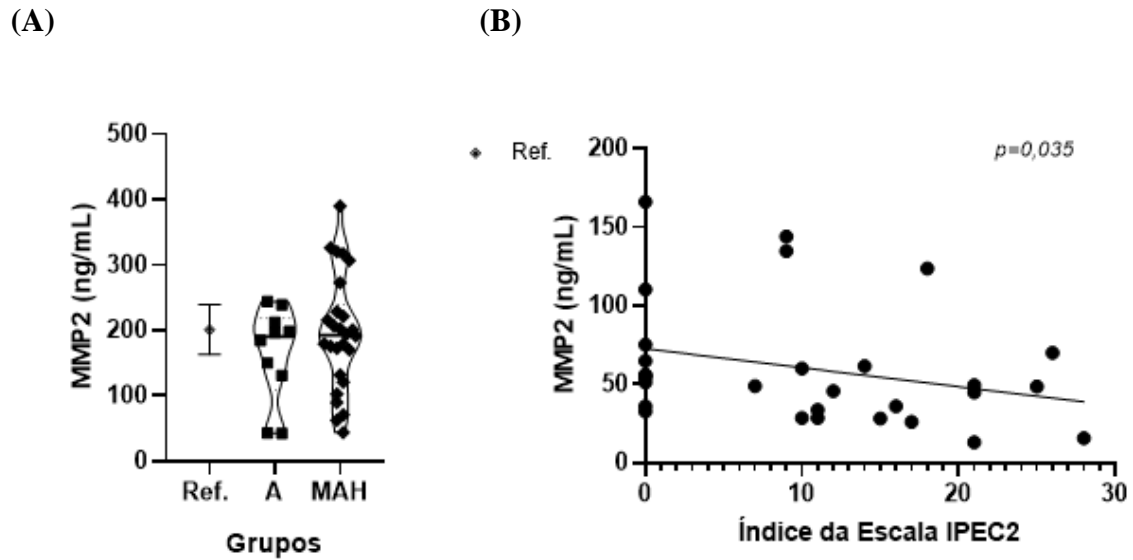


Figura 9 – Níveis de MMP-2 no plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1. (A) Dados da detecção de indivíduos vivendo com HTLV-1 assintomáticos (A; n=10) e portadores de MAH/PET (MAH; n=26). Valor de referência fornecido pelo fabricante do kit igual a 201 ± 38 (Ref. Média \pm desvio padrão; n=4). Detecção de MMP2 realizada por ELISA segundo as orientações do fabricante. (B) Análise de correlação de Spearman entre os níveis de MMP2 e Índice da Escala IPEC no plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1. Cada ponto identifica um indivíduo diferente.

5.5. Análise dos níveis de atividade LDH e nitrito no plasma

LDH, enzima catalisadora da oxidação reversível de piruvato a lactato, está presente de forma abundante em todo o organismo humano, no meio intracelular. Níveis elevados de LDH no sangue podem indicar lesão celular acentuada. Na **figura 10** foram reunidos os dados obtidos quanto à atividade de LDH nas amostras de plasma estudadas. A análise das amostras de plasma revelou maiores níveis de LDH em indivíduos não infectados (mediana = 1,826) quando comparado a aqueles encontrados nas amostras de indivíduos vivendo com HTLV-1 assintomáticos (mediana = 1,211) e portadores de MAH/PET (mediana = 1,011).

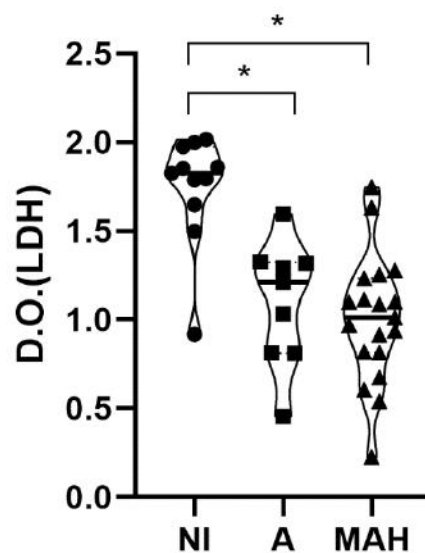


Figura 10 – Comparação dos níveis de atividade LDH no plasma. Nesta análise foram utilizadas amostras de plasma de indivíduos não infectados (NI; n=11), vivendo com HTLV-1 assintomáticos (A; n=9) e portadores de MAH/PET (MAH; n=19). Os valores encontrados no gráfico são da densidade óptica obtidos no teste colorimétrico. Cada ponto identifica um indivíduo diferente.

Além da atividade relacionada a LDH, mensuramos no plasma a concentração de nitrito. Foi encontrada diferença significativa entre as concentrações de nitrito no plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1 assintomáticos (mediana= 55,82 μ M) e portadores de MAH/PET (mediana= 34,91 μ M). Também foi vista correlação entre os níveis plasmáticos de nitrito e a escala IPEC2, com níveis mais altos de nitrito sendo encontrados no plasma de pacientes com menor incapacidade motora.

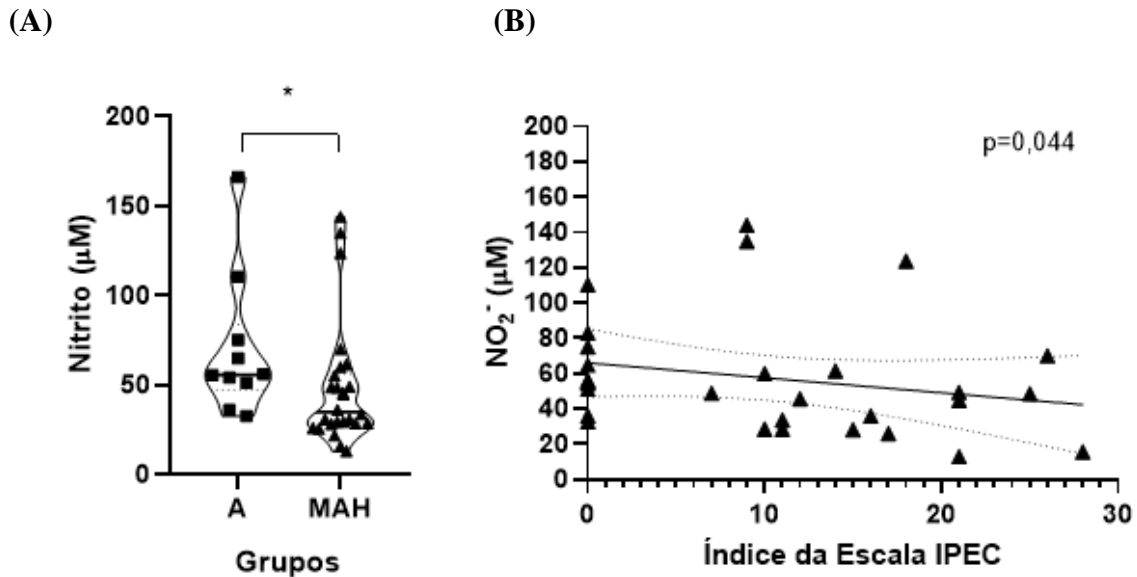


Figura 11 – (A) Diferença entre os níveis de nitrito no plasma de indivíduos portadores da MAH/PET. Nesta análise foram utilizadas amostras de plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1 assintomáticos (A; n=9) e portadores de MAH/PET (MAH; n=19). **(B) Análise de correlação de Spearman entre os níveis de NO_2^- no plasma e o Índice da Escala IPEC de indivíduos vivendo com HTLV-1.** Cada ponto identifica um indivíduo diferente.

6. DISCUSSÃO

Durante o estudo, buscou-se contribuir para o enriquecimento de achados prévios sobre a circulação de mediadores inflamatórios no plasma de indivíduos com HTLV-1. A identificação de biomarcadores para doenças associadas à infecção por HTLV-1 é uma estratégia essencial para garantir uma melhora no prognóstico de pacientes afetados. Em especial para MAH/PET, a identificação precoce do desenvolvimento da condição pode auxiliar em estratégias que teriam impacto direto na melhora da qualidade de vida desses indivíduos.

Estudos em busca de biomarcadores para MAH/PET ainda são escassos, mas estudos semelhantes sobre esclerose múltipla, amplamente disponíveis, podem auxiliar na elucidação de potenciais moléculas de interesse. A esclerose múltipla apresenta algumas semelhanças com a MAH/PET, já que ambas são doenças inflamatórias crônicas do sistema nervoso central, afetando a medula espinhal, e que têm como característica principal a fraqueza motora gradual dos membros inferiores. À fim de discussão, alguns dos resultados obtidos durante as análises

apresentadas previamente nesse trabalho foram comparados a achados semelhantes sobre pacientes com esclerose múltipla.

Algumas doenças crônicas do fígado causam aumento em imunoglobulinas, o que reflete num nível elevado de proteínas totais. Níveis elevados de proteínas totais no plasma também são observados em pacientes com doenças autoimunes, doenças inflamatórias crônicas e paraproteinemia (Marshall, 2012). Alguns estudos que buscam explorar alterações em proteínas no plasma de pacientes com HTLV-1 assintomáticos e com MAH/PET vêm sendo realizados recentemente, com muitos deles atribuindo níveis alterados de determinadas proteínas ao desenvolvimento de doenças associadas à infecção por HTLV-1. A análise do nível de proteínas totais no plasma realizada no presente estudo não revelou diferenças significativas entre as concentrações de proteínas totais no plasma de indivíduos não infectados e aqueles vivendo com HTLV-1. Além disso, foi revelado que não haviam diferenças significativas entre os níveis de proteínas totais entre pacientes assintomáticos e aqueles portadores de MAH/PET. Estudo de Almainan (2020) corrobora nossos achados. Ele descreveu um estudo de caso sobre indivíduo, diagnosticado para HTLV-1, que doava sangue com frequência (de 6 em 6 meses durante mais de 5 anos), comparando os dados, da análise do sangue do doador, anteriores ao diagnóstico. Foi constatado que os níveis de proteínas totais do indivíduo estudado diagnosticado com HTLV-1 estavam próximos aos níveis encontrados antes da infecção, e que se assemelhavam a níveis obtidos em indivíduos saudáveis. Dados semelhantes sobre as concentrações de proteínas totais no plasma foram encontrados em pacientes com esclerose múltipla, pois os autores do estudo não detectaram diferenças entre esses indivíduos e controles saudáveis (Aksungar *et al.*, 2008).

A enzima DAO é, principalmente, expressa no cérebro e medula espinhal, regiões de importância nos processos patológicos induzidos em MAH/PET. A relação de DAO com doenças do sistema nervoso central está ligada ao seu papel na desaminação oxidativa de D-serina, co-agonista de NDMARs. Os NDMARs estão envolvidos no desenvolvimento cerebral e na migração de células neuronais, e alterações em seu funcionamento já foram relacionadas a processos patogênicos em esquizofrenia (Papagni *et al.*, 2011) e esclerose lateral amiotrófica (Kondori *et al.*, 2018). Durante nosso estudo, não foi encontrada diferença significativa entre os níveis de DAO no plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1 assintomáticos e aqueles portadores de MAH/PET. No entanto, os níveis encontrados nos indivíduos vivendo com HTLV-1 se mostraram elevados quando comparados com níveis previamente encontrados em

indivíduos saudáveis (Lin *et al.*, 2017). Concentrações elevadas de DAO, como as encontradas nas amostras analisadas, podem ser correlacionadas à degradação aumentada de D-serina. A D-serina pode ser liberada de astrócitos e atua como co-agonista, junto com o glutamato, em NDMARs (interação no sítio de ligação de glicina), promovendo uma super estimulação destes receptores (Volterra e Meldolesi, 2005). Esse fenômeno de super estimulação de NMDARs leva a toxicidade, afetando importantes processos fisiológicos do sistema nervoso central (Volterra e Meldolesi, 2005). Katsuki e colaboradores (2004), demonstraram que adição de D-serina exógena promove a morte de neurônios corticais de ratos. Além disso, foram encontrados níveis aumentados de DAO no soro de pacientes com comprometimento cognitivo leve e Doença de Alzheimer. Para estes pacientes, a gravidade dos déficits cognitivos se correlacionou positivamente com os níveis aumentados de DAO. Também foi identificado um aumento dos níveis de D-serina no soro desses pacientes, em estudo que sugere que dano causado no SNC também esteja relacionado ao catabolismo da D-serina que promove a geração de peróxido de hidrogênio (Orzylowski *et al.*, 2021). Dentro deste contexto, temos o fato de que entre 50 a 80% dos indivíduos com MAH/PET apresentam alterações inespecíficas na massa branca cerebral, detectáveis em exames de ressonância magnética nuclear, mas em sua maioria sem sintomas clínicos (Puccioni-Sohler *et al.*, 2012). Além disso, comparado aos indivíduos não infectados, um maior percentual de indivíduos portadores do HTLV-1 apresenta depressão moderada ou grave, principalmente, os pacientes com MAH/PET (Gascón *et al.*, 2017). Os indivíduos infectados também podem apresentar quadros de ansiedade, que associados à depressão e ao déficit cognitivo comprometem a qualidade de vida do indivíduo (Rocha-Filho e Gonçalves, 2018). Champs e colaboradores (2019) observaram uma correlação positiva entre o comprometimento cognitivo e a presença de mediadores inflamatórios (TNF α , IL-6, IgG) no líquido cefalorraquidiano dos indivíduos com MAH/PET.

CXCL10, quimiocina ligante de CXCR3, é considerada um marcador para lesões inflamatórias crônicas, e sua relação com processos patogênicos em MAH/PET vem sendo estudada recentemente. CXCR3 direciona a migração de linfócitos T ao sistema nervoso central a partir da sinalização por CXCL10. O uso de CXCL10 como marcador para MAH/PET já havia sido estudado com amostras de líquido, sendo observada uma correlação entre a atividade da doença e níveis elevados de CXCL10. Foi constatado, anteriormente, que pacientes portadores de MAH/PET com alta atividade da doença apresentavam maiores níveis de CXCL10 no líquido, o que levaria a um prognóstico desfavorável. Por outro lado, menores níveis de CXCL10 demonstraram uma baixa atividade da doença, refletindo em um melhor

prognóstico (Sato *et al.*, 2018). Estudos prévios também haviam demonstrado CXCL10 como um marcador de resposta terapêutica em pacientes HAM/TSP, com concentrações mais baixas de CXCL10 no líquido sendo associadas a uma melhora no prognóstico (Tamaki *et al.*, 2019). Os níveis elevados de CXCL10 encontrados nas amostras de plasma de pacientes com HTLV-1 estudadas podem sugerir um direcionamento elevado de linfócitos T infectados ao sistema nervoso central, a partir da sinalização elevada de CXCR3 por CXCL10. Porém, diferente do que foi visto em estudos prévios com amostras de líquido, durante a presente análise não foi possível observar diferença significativa entre os níveis plasmáticos de CXCL10 entre indivíduos com HTLV-1 assintomáticos e aqueles portadores de MAH/PET. Entretanto, encontramos uma correlação negativa entre DAO e CXCL10, sugerindo que a atividade de DAO pode estar associada a um período mais precoce do desenvolvimento da doença enquanto que os níveis de CXCL10 mais elevados são encontrados em pacientes com maior grau de incapacidade motora. Para melhor correlacionar estes resultados seria necessário um número maior de pacientes com avaliação da Escala IPEC-2.

Níveis alterados de IL-6 foram associados a inflamação crônica (Kaplanski *et al.*, 2003; Kaur *et al.*, 2020). Estudos prévios demonstraram a presença de maiores concentrações de IL-6 no soro e líquido de pacientes com MAH/PET, quando comparadas às concentrações presentes em amostras de indivíduos com HTLV-1 assintomáticos e controles saudáveis, e esses níveis se assemelhavam a aqueles de pacientes com esclerose múltipla (Nishimoto *et al.*, 1990). Nas análises realizadas com plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1 no presente estudo, diferente dos dados encontrados anteriormente, não foi encontrada diferença significativa entre os níveis de IL-6 no plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1 assintomáticos e aqueles portadores de MAH/PET.

Como mencionado anteriormente, metaloproteinases de matriz como a MMP-2 são importantes para a regulação de processos fisiológicos normais, tendo papel inclusive no controle da migração celular através da barreira hematoencefálica. Foi demonstrado que a patogênese de MAH/PET depende da quebra da barreira hematoencefálica, ainda que esse mecanismo não seja totalmente entendido (Afonso *et al.*, 2008). Níveis elevados de MMP-2 foram encontrados após autópsia do cérebro de indivíduos com esclerose múltipla, e esses níveis elevados em esclerose múltipla foram novamente constatados em amostras de plasma (Avolio *et al.*, 2003) e tiveram sua expressão elevada em monócitos descrita (Bar-Or *et al.*, 2003). Teorias prévias sugeriam que níveis aumentados de MMP-2 corresponderiam a estágios avançados crônicos de esclerose múltipla (Avolio *et al.*, 2003). Diferentemente, durante o

presente estudo foram encontrados menores níveis de MMP-2 no plasma de pacientes com maior grau de incapacidade motora. A correlação negativa entre os níveis plasmáticos de MMP-2 e a escala IPEC2 pode ser associada ao grau de lesão no sistema nervoso central, sugerindo que o aumento do grau de incapacidade motora pode estar relacionado com a atividade da MMP-2. Maiores estudos são necessários para entender essa associação, que sugere correlação com o mecanismo de quebra da barreira hematoencefálica.

Níveis elevados de LDH no sangue apontam para lesão celular acentuada, e foram previamente comprovados em pacientes com ATLL, outra doença associada à infecção pelo HTLV-1 (Lymphoma Study Group, 1991; Nishioka *et al.*, 2005; Tsukasaki e Tobinai, 2013). Nossa análise revelou maiores níveis de LDH no plasma de indivíduos não infectados saudáveis, em comparação aos níveis encontrados em indivíduos vivendo com HTLV-1, tanto assintomáticos quanto portadores de MAH/PET.

Os níveis de nitrito, aqui estudados, dependem do metabolismo de NO, que por sua vez media diversas funções celulares como a neurotransmissão e regulação de respostas imunes. O NO pode contribuir para dano tecidual ao causar vasodilatação, que pode ocorrer em conjunto à distúrbios na permeabilidade da barreira hematoencefálica. A atividade elevada de NOSintase teve papel como mediador em neuroinflamações reportado em doenças neurológicas, como a esclerose múltipla (Ljubisavljevic *et al.*, 2014). Durante análise das concentrações de nitrito em amostras de plasma de indivíduos vivendo com HTLV-1, constatamos que os níveis em pacientes assintomáticos eram mais elevados quando em comparação a aqueles encontrados em pacientes portadores de MAH/PET. A correlação encontrada entre níveis plasmáticos de nitrito elevados no plasma de pacientes com menor incapacidade motora, medida pela escala IPEC2, não corresponde a dados reportados previamente para esclerose múltipla, onde maiores níveis de NO no líquido sugerem maior deficiência clínica. Alguns estudos que visavam correlacionar a concentração de nitrito no plasma com a capacidade de exercício de indivíduos demonstraram que em adultos saudáveis o estresse fisiológico levava a um aumento de NOS endotelial, que ultrapassava os níveis de consumo e causava um aumento visível nos níveis de nitrito (Rassaf *et al.*, 2007; Dobrosielski *et al.*, 2010). Em idosos, os níveis de nitrito falhavam em aumentar após exercício, sugerindo uma inabilidade ou deficiência na produção de NOS endotelial durante estresse fisiológico (Dobrosielski *et al.*, 2010). Os níveis mais baixos de nitrito em pacientes com MAH/PET, e ainda aqueles com maior incapacidade motora, podem também estar relacionados a alterações na capacidade de produção de NOS, como observado em idosos.

No entanto, também não podemos descartar a falta da análise dos níveis de nitrato, que podem alterar a interpretação destes dados.

Um dos dados atualmente utilizado para monitorar o possível avanço do quadro em pacientes com HTLV-1 é a carga pró-viral. Durante o presente estudo, os dados disponíveis nos prontuários do INI/FIOCRUZ foram analisados, mas não foi encontrada correlação entre a carga pró-viral e os níveis plasmáticos das substâncias estudadas.

7. CONCLUSÃO

Através da análise de níveis de proteínas totais, DAO, CXCL10, IL-6, MMP-2, LDH e nitrito no plasma de pacientes com HTLV-1, esperamos colaborar com a possível identificação de biomarcadores associados ao desenvolvimento de MAH/PET. Em indivíduos com HTLV-1, foram observadas alterações significativas nas concentrações plasmáticas de CXCL10, DAO, LDH e nitrito, sugerindo relação dessas moléculas com a patogênese e utilidade no uso como biomarcadores de evolução da doença. Os dados obtidos a partir do estudo foram reunidos na **figura 12**.

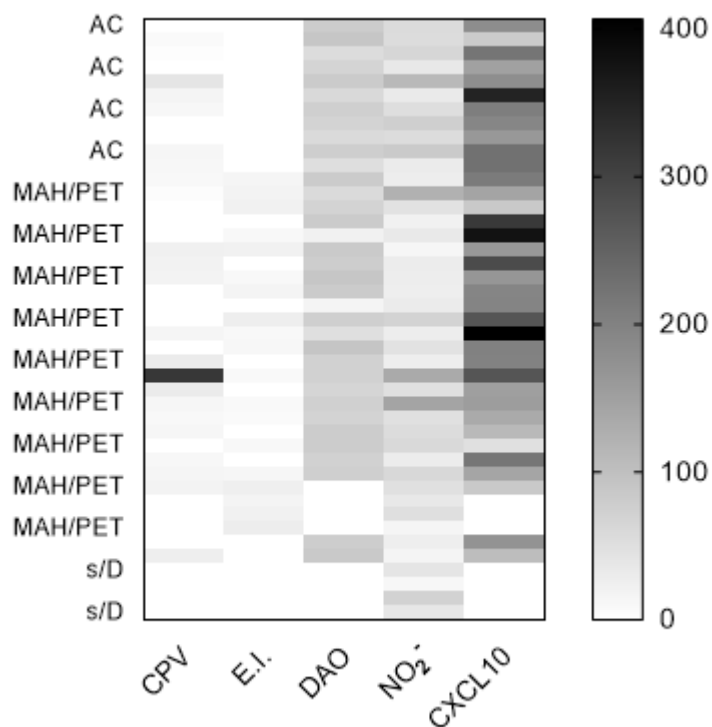


Figura 12 – Correlações entre os dados obtidos durante o estudo. A figura reúne análises realizadas a partir de amostras de plasma de indivíduos com HTLV-1 assintomáticos (AC), portadores de MAH/PET e não infectados (s/D) sobre a carga pró-viral (CPV), escala IPEC2 (E.I), e as concentrações de DAO, NO₂- e CXCL10.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, M.; Umehara, F.; Kubota, R.; Moritoyo, T.; Izumo, S.; Osame, M. Activation of Macrophages/Microglia with the Calcium-Binding Proteins MRP14 and MRP8 Is Related to the Lesional Activities in the Spinal Cord of HTLV-I Associated Myelopathy. *J Neurol* **1999**, *246* (5), 358–364.
- Afonso, P. V.; Ozden, S.; Cumont, M.-C.; Seilhean, D.; Cartier, L.; Rezaie, P.; Mason, S.; Lambert, S.; Huerre, M.; Gessain, A.; Couraud, P.-O.; Pique, C.; Ceccaldi, P.-E.; Romero, I. A. Alteration of Blood–Brain Barrier Integrity by Retroviral Infection. *PLOS Pathogens* **2008**, *4* (11), e1000205.
- Agassandian, M.; Tedrow, J. R.; Sembrat, J.; Kass, D. J.; Zhang, Y.; Goncharova, E. A.; Kaminski, N.; Mallampalli, R. K.; Vuga, L. J. VCAM-1 Is a TGF-B1 Inducible Gene Upregulated in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Cell Signal* **2015**, *27* (12), 2467–2473.
- Almaiman AA. Changes in Serum Protein and Enzyme Levels in Human T Lymphotropic Virus-1-Infected Patient. *J Coll Physicians Surg Pak* **2020**; 30(10):1092-1095.
- Aksungar, F. B.; Topkaya, A. E.; Yildiz, Z.; Sahin, S.; Turk, U. Coagulation Status and Biochemical and Inflammatory Markers in Multiple Sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience* **2008**, *15* (4), 393–397.
- Araujo, A.; Silva, M. The HTLV-1 neurological complex. *Lancet Neurol* **2006**; *5*: 1068–76
- Avolio, C.; Ruggieri, M.; Giuliani, F.; Liuzzi, G. M.; Leante, R.; Riccio, P.; Livrea, P.; Trojano, M. Serum MMP-2 and MMP-9 Are Elevated in Different Multiple Sclerosis Subtypes. *Journal of Neuroimmunology* **2003**, *136* (1), 46–53.
- Bangham, CRM. HTLV-1 infections. *Journal of Clinical Pathology* **2000**, (53) 581-586.
- Bangham, C. R. M.; Araujo, A.; Yamano, Y.; Taylor, G. P. HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Nat Rev Dis Primers* **2015**, *1* (1), 15012.
- Banks, R. E.; Gearing, A. J.; Hemingway, I. K.; Norfolk, D. R.; Perren, T. J.; Selby, P. J. Circulating Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), E-Selectin and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Human Malignancies. *Br J Cancer* **1993**, *68* (1), 122–124.
- Bar-Or, A.; Nuttall, R. K.; Duddy, M.; Alter, A.; Kim, H. J.; Ifergan, I.; Pennington, C. J.; Bourgoin, P.; Edwards, D. R.; Yong, V. W. Analyses of All Matrix Metalloproteinase Members in Leukocytes Emphasize Monocytes as Major Inflammatory Mediators in Multiple Sclerosis. *Brain* **2003**, *126* (Pt 12), 2738–2749.
- Boffa, J. Beta-2 Microglobulin as a Marker for HIV Infection. *J Insur Med* **1994**, *26* (1), 14–15.
- Brites, C.; Grassi, M. F.; Quaresma, J. A. S.; Ishak, R.; Vallinoto, A. C. R. Pathogenesis of HTLV-1 Infection and Progression Biomarkers: An Overview. *Braz J Infect Dis* **2021**, *25* (3), 101594.
- Cassar, O.; Charavay, F.; Touzain, F.; Jeannin, P.; Grangeon, J.-P.; Laumond, S.; Chungue, E.; Martin, P. M. V.; Gessain, A. A Novel Human T-Lymphotropic Virus Type 1c Molecular Variant in an Indigenous Individual from New Caledonia, Melanesia. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2017**, *11* (1), e0005278.
- Castellani, L. W.; Navab, M.; Van Lenten, B. J.; Hedrick, C. C.; Hama, S. Y.; Goto, A. M.; Fogelman, A. M.; Lusis, A. J. Overexpression of Apolipoprotein AII in Transgenic Mice Converts High Density Lipoproteins to Proinflammatory Particles. *J Clin Invest* **1997**, *100* (2), 464–474.
- Challa-Malladi, M.; Lieu, Y. K.; Califano, O.; Holmes, A. B.; Bhagat, G.; Murty, V. V.; Dominguez-Sola, D.; Pasqualucci, L.; Dalla-Favera, R. Combined Genetic Inactivation of B2-Microglobulin and CD58 Reveals Frequent Escape from Immune Recognition in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancer Cell* **2011**, *20* (6), 728–740.
- Champs, A. P. S.; de Azeredo Passos, V. M.; Carvalho, G.; Barreto, S. M.; Meirelles, C.; Caramelli, P. Cognitive Impairment in HTLV-1-Associated Myelopathy, Proviral Load and Inflammatory Markers. *Int J Infect Dis* **2019**, *84*, 121–126.
- Cook, L. B.; Elemans, M.; Rowan, A. G.; Asquith, B. HTLV-1: Persistence and Pathogenesis. *Virology* **2013**, *435* (1), 131–140.

- Dhawan, S.; Weeks, B. S.; Abbasi, F.; Gralnick, H. R.; Notkins, A. L.; Klotman, M. E.; Yamada, K. M.; Klotman, P. E. Increased Expression of A4 β 1 and A5 β 1 Integrins on HTLV-I-Infected Lymphocytes. *Virology* **1993**, *197* (2), 778–781.
- Dobrosielski, D. A.; Presley, T.; Perlegas, A.; Marsh, A. P.; Kim-Shapiro, D.; Rejeski, W. J. Plasma Nitrite Response in Older Women to a Physical Function Test. *Aging Clin Exp Res* **2010**, *22* (5–6), 383–386.
- Dufour, D. R., Lott, J.A., Nolte, F. S., Gretch, D.R., Koff, R. S., Seeff, L.B. Diagnosis and Monitoring of Hepatic Injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests. *Clinical Chemistry* **2000**, *46*:12 2027–2049.
- Fernandez, F.; Barrio, V.; Guzman, J.; Huertas, M. D.; Zapatero, M.; Miguel, M. D. de; Mallol, J. Beta-2Microglobulin in the Assessment of Renal Function in Full Term Newborns Following Perinatal Asphyxia. **1989**, *17* (6), 453–459.
- Fisher, G. H.; D’Aniello, A.; Vetere, A.; Padula, L.; Cusano, G. P.; Man, E. H. Free D-Aspartate and D-Alanine in Normal and Alzheimer Brain. *Brain Res Bull* **1991**, *26* (6), 983–985.
- Fisher, G.; Lorenzo, N.; Abe, H.; Fujita, E.; Frey, W. H.; Emory, C.; Di Fiore, M. M.; D’Aniello, A. Free D- and L-Amino Acids in Ventricular Cerebrospinal Fluid from Alzheimer and Normal Subjects. *Amino Acids* **1998**, *15* (3), 263–269.
- Fuzii, H. T.; da Silva Dias, G. A.; de Barros, R. J. S.; Falcão, L. F. M.; Quaresma, J. A. S. Immunopathogenesis of HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). *Life Sci* **2014**, *104* (1–2), 9–14.
- Gallo, R. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene* **2005** *24*, 5926–5930.
- Garrido, F.; Cabrera, T.; Aptsiauri, N. “Hard” and “Soft” Lesions Underlying the HLA Class I Alterations in Cancer Cells: Implications for Immunotherapy. *International Journal of Cancer* **2010**, *127* (2), 249–256.
- Gascón, M. R. P.; Casseb, J.; Smid, J.; Vidal, J. E.; Fonseca, L. a. M.; Paiva, A.; Haziot, M. J.; Penalva de Oliveira, A. C. Cognitive Impairment Is Frequent among Symptomatic Carriers of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1), Regardless of Their Clinical Status. *J Neurol Sci* **2017**, *377*, 185–189.
- Gessain, A., Cassar, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Frontiers in Microbiology* **2012**; (3) 388.
- Giraudon, P., Buart, S., Bernard, A., & Belin, M.-F. Cytokines secreted by glial cells infected with HTLV-I modulate the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and their natural inhibitor (TIMPs): possible involvement in neurodegenerative processes. *Molecular Psychiatry* **1997**, *2*(2), 107–110.
- Giustarini, D.; Rossi, R.; Milzani, A.; Dalle-Donne, I. Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. *Methods Enzymol* **2008**, *440*, 361–380.
- Giusti, R. M.; Maloney, E. M.; Hanchard, B.; Morgan, O. S.; Steinberg, S. M.; Wachter, H.; Williams, E.; Cranston, B.; Fuchs, D.; Manns, A. Differential Patterns of Serum Biomarkers of Immune Activation in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis, and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **1996**, *5* (9), 699–704.
- Gross, C.; Thoma-Kress, A. K. Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. *Viruses* **2016**, *8* (3), 74.
- Guerrero, C. L. H., Yamashita, Y., Miyara, M., Imaizumi, N., Kato, M., Sakihama, S., Hayashi, M., Miyagi, T., Karimata, K., Uchihara, J., Ohshiro, K., Todoroki, J., Nakachi, S., Morishima, S., Karube, K., Tanaka, Y., Masuzaki, H., Fukushima, T. Proteomic profiling of HTLV-1 carriers and ATL patients reveals sTNFR2 as a novel diagnostic biomarker for acute ATL. *Blood Adv.* **2020** *4* (6), 1062–1071.
- Hicklin, D. J.; Wang, Z.; Arienti, F.; Rivoltini, L.; Parmiani, G.; Ferrone, S. Beta2-Microglobulin Mutations, HLA Class I Antigen Loss, and Tumor Progression in Melanoma. *J Clin Invest* **1998**, *101* (12), 2720–2729.
- Higuchi, M., Matsuda, T., Mori, N., Yamada, Y., Horie, R., Watanabe, T., Takahashi, M., Oie, M., & Fujii, M.. Elevated expression of CD30 in adult T-cell leukemia cell lines: possible role in constitutive NF-kappaB activation. *Retrovirology* **2005**, *2*, 29.

- Hildreth, J. E.; Subramaniam, A.; Hampton, R. A. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Induced Syncytium Formation Mediated by Vascular Cell Adhesion Molecule-1: Evidence for Involvement of Cell Adhesion Molecules in HTLV-1 Biology. *J Virol* **1997**, *71* (2), 1173–1180.
- Iademarco, M. F.; McQuillan, J. J.; Rosen, G. D.; Dean, D. C. Characterization of the Promoter for Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1). *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267* (23), 16323–16329.
- Ishihara, M., Araya, N., Sato, T., Saichi, N., Fujii, R., Yamano, Y., & Ueda, K.. A plasma diagnostic model of human T-cell leukemia virus-1 associated myelopathy. *Annals of clinical and translational neurology* **2015**, *2*(3), 231–240.
- Izumo, S. Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Neuropathology* **2010**; *30*, 480–485
- Jafarian, M.; Mozhgani, S.-H.; Patrad, E.; Vaziri, H.; Rezaee, S. A.; Akbarin, M. M.; Norouzi, M. Evaluation of INOS, ICAM-1, and VCAM-1 Gene Expression: A Study of Adult T Cell Leukemia Malignancy Associated with HTLV-1. *Arch Virol* **2017**, *162* (4), 1009–1015.
- Juneja, H. S.; Schmalsteig, F. C.; Lee, S.; Chen, J. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and VLA-4 Are Obligatory Adhesion Proteins in the Heterotypic Adherence between Human Leukemia/Lymphoma Cells and Marrow Stromal Cells. *Exp Hematol* **1993**, *21* (3), 444–450.
- Kawazoe, T.; Park, H. K.; Iwana, S.; Tsuge, H.; Fukui, K. Human D-Amino Acid Oxidase: An Update and Review. *Chem Rec* **2007**, *7* (5), 305–315.
- Kaplanski, G.; Marin, V.; Montero-Julian, F.; Mantovani, A.; Farnarier, C. IL-6: A Regulator of the Transition from Neutrophil to Monocyte Recruitment during Inflammation. *Trends in Immunology* **2003**, *24* (1), 25–29.
- Katsuki, H.; Nonaka, M.; Shirakawa, H.; Kume, T.; Akaike, A. Endogenous D-Serine Is Involved in Induction of Neuronal Death by N-Methyl-D-Aspartate and Simulated Ischemia in Rat Cerebrocortical Slices. *J Pharmacol Exp Ther* **2004**, *311* (2), 836–844.
- Kaur, S.; Bansal, Y.; Kumar, R.; Bansal, G. A Panoramic Review of IL-6: Structure, Pathophysiological Roles and Inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2020**, *28* (5), 115327.
- Khoronenkova, S. V.; Tishkov, V. I. D-Amino Acid Oxidase: Physiological Role and Applications. *Biochemistry (Mosc)* **2008**, *73* (13), 1511–1518.
- Kirk, P. D.; Witkover, A.; Courtney, A.; Lewin, A. M.; Wait, R.; Stumpf, M. P.; Richardson, S.; Taylor, G. P.; Bangham, C. R. Plasma Proteome Analysis in HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Retrovirology* **2011**, *8* (1), 81.
- Kleinbongard, P.; Dejam, A.; Lauer, T.; Jax, T.; Kerber, S.; Gharini, P.; Balzer, J.; Zotz, R. B.; Scharf, R. E.; Willers, R.; Schechter, A. N.; Feelsch, M.; Kelm, M. Plasma Nitrite Concentrations Reflect the Degree of Endothelial Dysfunction in Humans. *Free Radic Biol Med* **2006**, *40* (2), 295–302.
- Kondori, N. R.; Paul, P.; Robbins, J. P.; Liu, K.; Hildyard, J. C. W.; Wells, D. J.; de Belleruche, J. S. Focus on the Role of D-Serine and D-Amino Acid Oxidase in Amyotrophic Lateral Sclerosis/Motor Neuron Disease (ALS). *Front Mol Biosci* **2018**, *5*, 8.
- Kuessel, L.; Wenzl, R.; Proestling, K.; Balendran, S.; Pateisky, P.; Yotova, null; Yerlikaya, G.; Streubel, B.; Husslein, H. Soluble VCAM-1/Soluble ICAM-1 Ratio Is a Promising Biomarker for Diagnosing Endometriosis. *Hum Reprod* **2017**, *32* (4), 770–779.
- Kuroda, Y.; Matsui, M. Cerebrospinal Fluid Interferon-Gamma Is Increased in HTLV-I-Associated Myelopathy. *Journal of Neuroimmunology* **1993**, *42* (2), 223–226.
- Lin, C.-H.; Yang, H.-T.; Chiu, C.-C.; Lane, H.-Y. Blood Levels of D-Amino Acid Oxidase vs. D-Amino Acids in Reflecting Cognitive Aging. *Sci Rep* **2017**, *7* (1), 14849.
- Liu, M.; Guo, S.; Hibbert, J. M.; Jain, V.; Singh, N.; Wilson, N. O.; Stiles, J. K. CXCL10/IP-10 in Infectious Diseases Pathogenesis and Potential Therapeutic Implications. *Cytokine Growth Factor Rev* **2011**, *22* (3), 121–130.

- Ljubisavljevic, S.; Stojanovic, I.; Pavlovic, R.; Pavlovic, D. The Importance of Nitric Oxide and Arginase in the Pathogenesis of Acute Neuroinflammation: Are Those Contra Players with the Same Direction? *Neurotox Res* **2014**, *26* (4), 392–399.
- Lymphoma Study Group (1984-1987). Major Prognostic Factors of Patients with Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma: A Cooperative Study. *Leuk Res* **1991**, *15* (2–3), 81–90.
- Mahieux, R.; Gessain, A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 Viruses: Discovery, Epidemiology, Serology and Molecular Aspects. *Viruses* **2011**, *3* (7), 1074–1090.
- Marshall, W. Total protein (serum, plasma): Clinical uses of measurement and interpretation of results. *Association for Clinical Biochemistry* **2012**
- Martin, J. L.; Maldonado, J. O.; Mueller, J. D.; Zhang, W.; Mansky, L. M. Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. *Viruses* **2016**, *8* (2), E31.
- Meager, A.; Bird, C.; Mire-Sluis, A. Assays for Measuring Soluble Cellular Adhesion Molecules and Soluble Cytokine Receptors. *J Immunol Methods* **1996**, *191* (2), 97–112.
- Murphy, P. M. CXC Chemokines. *Encyclopedia of Hormones*; Henry, H. L., Norman, A. W., Eds.; Academic Press: New York, **2003**; pp 351–362.
- Nakamura, S.; Nagano, I.; Yoshioka, M.; Shimazaki, S.; Onodera, J.; Kogure, K. Detection of Tumor Necrosis Factor-Alpha-Positive Cells in Cerebrospinal Fluid of Patients with HTLV-I-Associated Myelopathy. *J Neuroimmunol* **1993**, *42* (2), 127–130.
- Nascimento, C. R.; Lima, M. A.; de Andrada Serpa, M. J.; Espindola, O.; Leite, A. C. C.; Echevarria-Lima, J. Monocytes from HTLV-1-Infected Patients Are Unable to Fully Mature into Dendritic Cells. *Blood* **2011**, *117* (2), 489–499.
- Narikawa, K.; Fujihara, K.; Misu, T.; Feng, J.; Fujimori, J.; Nakashima, I.; Miyazawa, I.; Saito, H.; Sato, S.; Itoyama, Y. CSF-Chemokines in HTLV-I-Associated Myelopathy: CXCL10 up-Regulation and Therapeutic Effect of Interferon-Alpha. *J Neuroimmunol* **2005**, *159* (1–2), 177–182.
- Navarro-Hernández, R. E.; Oregon-Romero, E.; Vázquez-Del Mercado, M.; Rangel-Villalobos, H.; Palafox-Sánchez, C. A.; Muñoz-Valle, J. F. Expression of ICAM1 and VCAM1 Serum Levels in Rheumatoid Arthritis Clinical Activity. Association with Genetic Polymorphisms. *Dis Markers* **2009**, *26* (3), 119–126.
- Nilsson, K.; Evrin, P. E.; Welsh, K. I. Production of Beta 2-Microglobulin by Normal and Malignant Human Cell Lines and Peripheral Lymphocytes. *Transplant Rev* **1974**, *21* (0), 53–84.
- Nishimoto, N.; Yoshizaki, K.; Eiraku, N.; Machigashira, K.; Tagoh, H.; Ogata, A.; Kuritani, T.; Osame, M.; Kishimoto, T. Elevated Levels of Interleukin-6 in Serum and Cerebrospinal Fluid of HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *J Neurol Sci* **1990**, *97* (2–3), 183–193.
- Nishimura, M., Maeda, M., Matsuoaka, M., Mine, H., Saji, H., Matsui, M., Kuroda, Y., Kawakami, H., Uchiyama, T. Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor receptors type 1 and 2, lymphotoxin- α , and HLA-DRB1 gene polymorphisms in human T-Cell lymphotropic virus type I associated myelopathy. *Human Immunology* **2000** *61* (12), 1262–1269.
- Nishioka, C.; Takemoto, S.; Kataoka, S.; Yamanaka, S.; Moriki, T.; Shoda, M.; Watanabe, T.; Taguchi, H. Serum Level of Soluble CD30 Correlates with the Aggressiveness of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Cancer Science* **2005**, *96* (11), 810–815.
- Nomoto, M.; Utatsu, Y.; Soejima, Y.; Osame, M. Neopterin in Cerebrospinal Fluid: A Useful Marker for Diagnosis of HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Neurology* **1991**, *41* (3), 457.
- Odink, K.; Cerletti, N.; Brügger, J.; Clerc, R. G.; Tarcsay, L.; Zwadlo, G.; Gerhards, G.; Schlegel, R.; Sorg, C. Two Calcium-Binding Proteins in Infiltrate Macrophages of Rheumatoid Arthritis. *Nature* **1987**, *330* (6143), 80–82.
- Orzylowski, M.; Fujiwara, E.; Mousseau, D. D.; Baker, G. B. An Overview of the Involvement of D-Serine in Cognitive Impairment in Normal Aging and Dementia. *Front Psychiatry* **2021**, *12*, 754032.
- Pagana, K. D. & Pagana, T. J.. *Mosby's Diagnostic and Laboratory Test Reference 8th Edition: Mosby, Inc., Saint Louis, MO. 2007*. Pp 155-156.

- Papagni, S. A.; Mechelli, A.; Prata, D. P.; Kambeitz, J.; Fu, C. H. Y.; Picchioni, M.; Walshe, M.; Toulopoulou, T.; Bramon, E.; Murray, R. M.; Collier, D. A.; Bellomo, A.; McGuire, P. Differential Effects of DAAO on Regional Activation and Functional Connectivity in Schizophrenia, Bipolar Disorder and Controls. *NeuroImage* **2011**, *56* (4), 2283–2291.
- Pasquier, A.; Alais, S.; Roux, L.; Thoulouze, M.-I.; Alvarez, K.; Journo, C.; Dutartre, H.; Mahieux, R. How to Control HTLV-1-Associated Diseases: Preventing de Novo Cellular Infection Using Antiviral Therapy. *Frontiers in Microbiology* **2018**, *9*, 278.
- Percher, F.; Jeannin, P.; Martin-Latil, S.; Gessain, A.; Afonso, P. V.; Vidy-Roche, A.; Ceccaldi, P.-E. Mother-to-Child Transmission of HTLV-1 Epidemiological Aspects, Mechanisms and Determinants of Mother-to-Child Transmission. *Viruses* **2016**, *8* (2), 40.
- Peterson, P. A.; Cunningham, B. A.; Berggård, I.; Edelman, G. M. B2-Microglobulin—A Free Immunoglobulin Domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1972**, *69* (7), 1697–1701.
- Poetker, S. K. W.; Porto, A. F.; Giozza, S. P.; Muniz, A. L.; Caskey, M. F.; Carvalho, E. M.; Glesby, M. J. Clinical Manifestations in Individuals with Recent Diagnosis of HTLV Type I Infection. *Journal of Clinical Virology* **2011**, *51* (1), 54–58.
- Poiesz, B. J.; Ruscetti, F. W.; Gazdar, A. F.; Bunn, P. A.; Minna, J. D.; Gallo, R. C. Detection and Isolation of Type C Retrovirus Particles from Fresh and Cultured Lymphocytes of a Patient with Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **1980**, *77* (12), 7415.
- Poiesz, B., Ruscetti, F., Reitz, M. *et al.* Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukaemia. *Nature* **1981**, *294*, 268–271.
- Pollegioni, L.; Piubelli, L.; Sacchi, S.; Pilone, M. S.; Molla, G. Physiological Functions of D-Amino Acid Oxidases: From Yeast to Humans. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64* (11), 1373–1394.
- Poulik, M. D.; Gold, P.; Shuster, J.; Bernier, G. M. B2-Microglobulin: Methods and Clinical Applications. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **1979**, *10* (3), 225–245.
- Puccioni-Sohler, M.; Yamano, Y.; Rios, M.; Carvalho, S. M. F.; Vasconcelos, C. C. F.; Papais-Alvarenga, R.; Jacobson, S. Differentiation of HAM/TSP from Patients with Multiple Sclerosis Infected with HTLV-I. *Neurology* **2007**, *68* (3), 206–213.
- Rassaf, T., Lauer, T., Heiss, C., Balzer, J., Mangold, S., Leyendecker, T., Rottler, J., Dexhage, C., Meyer, C., Kelm, M. Nitric Oxide Synthase-Derived Plasma Nitrite Predicts Exercise Capacity. *British journal of sports medicine* **2007**, *41* (10).
- Richards, T. J.; Kaminski, N.; Baribaud, F.; Flavin, S.; Brodmerkel, C.; Horowitz, D.; Li, K.; Choi, J.; Vuga, L. J.; Lindell, K. O.; Klesen, M.; Zhang, Y.; Gibson, K. F. Peripheral Blood Proteins Predict Mortality in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **2012**, *185* (1), 67–76.
- Rocha-Filho, P. A. S.; Goncalves, L. R. Depression and Anxiety Disorders among Patients with Human T-Cell Lymphotropic Virus Type-1: A Cross-Sectional Study with a Comparison Group. *Rev Soc Bras Med Trop* **2018**, *51* (3), 357–360.
- Rosadas, C.; Malik, B.; Taylor, G. P.; Puccioni-Sohler, M. Estimation of HTLV-1 Vertical Transmission Cases in Brazil per Annum. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **2018**, *12* (11), e0006913.
- Rosadas, C.; Espinosa, A.M.; Gonçalves, D.U.; Caterino-de-Araujo, A.; Assone, T.; Ishak, R. Prevalência da Infecção por HTLV-1/2 no Brasil. *Boletim Epidemiológico*. **2020**, *51* (48), 25–33.
- Roth, J.; Teigelkamp, S.; Wilke, M.; Grün, L.; Tümmler, B.; Sorg, C. Complex Pattern of the Myelo-Monocytic Differentiation Antigens MRP8 and MRP14 during Chronic Airway Inflammation. *Immunobiology* **1992**, *186* (3–4), 304–314.
- Rugtveit, J.; Brandtzaeg, P.; Halstensen, T. S.; Fausa, O.; Scott, H. Increased Macrophage Subset in Inflammatory Bowel Disease: Apparent Recruitment from Peripheral Blood Monocytes. *Gut* **1994**, *35* (5), 669–674.
- Sadamori, N. Clinical and Biological Significance of Serum Tumor Markers in Adult T-cell Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*. **1995**. *22*(5-6), 415–419.

- Sato, T.; Coler-Reilly, A.; Utsunomiya, A.; Araya, N.; Yagishita, N.; Ando, H.; Yamauchi, J.; Inoue, E.; Ueno, T.; Hasegawa, Y.; Nishioka, K.; Nakajima, T.; Jacobson, S.; Izumo, S.; Yamano, Y. CSF CXCL10, CXCL9, and Neopterin as Candidate Prognostic Biomarkers for HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *PLoS Negl Trop Dis* **2013**, *7* (10), e2479.
- Sato, T.; Yagishita, N.; Tamaki, K.; Inoue, E.; Hasegawa, D.; Nagasaka, M.; Suzuki, H.; Araya, N.; Coler-Reilly, A.; Hasegawa, Y.; Tsuboi, Y.; Takata, A.; Yamano, Y. Proposal of Classification Criteria for HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis Disease Activity. *Frontiers in Microbiology* **2018**, *9*.
- Schardijn, G. H. C.; van Eps, L. W. S. B2-Microglobulin: Its Significance in the Evaluation of Renal Function. *Kidney International* **1987**, *32* (5), 635–641.
- Schlesinger, M.; Bendas, G. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)—An Increasing Insight into Its Role in Tumorigenicity and Metastasis. *International Journal of Cancer* **2015**, *136* (11), 2504–2514.
- Shang, Y.; Fu, X.; Chang, Y.; Li, Y.; Zhang, M. B2 Microglobulin Is a Novel Prognostic Marker of Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 12907.
- Taichman, D. B.; Cybulsky, M. I.; Djaffar, I.; Longenecker, B. M.; Teixidó, J.; Rice, G. E.; Aruffo, A.; Bevilacqua, M. P. Tumor Cell Surface Alpha 4 Beta 1 Integrin Mediates Adhesion to Vascular Endothelium: Demonstration of an Interaction with the N-Terminal Domains of INCAM-110/VCAM-1. *Cell Regul* **1991**, *2* (5), 347–355.
- Tamaki, K.; Sato, T.; Tsugawa, J.; Fujioka, S.; Yagishita, N.; Araya, N.; Yamauchi, J.; Coler-Reilly, A. L. G.; Nagasaka, M.; Hasegawa, Y.; Yamano, Y.; Tsuboi, Y. Cerebrospinal Fluid CXCL10 as a Candidate Surrogate Marker for HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Front Microbiol* **2019**, *10*, 2110.
- Tattermusch, S.; Bangham, C. R. M. HTLV-1 Infection: What Determines the Risk of Inflammatory Disease? *Trends Microbiol* **2012**, *20* (10), 494–500.
- Thompson, P. A.; Berbée, J. F. P.; Rensen, P. C. N.; Kitchens, R. L. Apolipoprotein A-II Augments Monocyte Responses to LPS by Suppressing the Inhibitory Activity of LPS-Binding Protein. *Innate Immunity* **2008**, *14* (6), 365–374.
- Tsukasaki, K.; Tobinai, K. Biology and Treatment of HTLV-1 Associated T-Cell Lymphomas. *Best Practice & Research Clinical Haematology* **2013**, *26* (1), 3–14.
- Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **1977**, *50*(3) 481-492.
- Umehara, F.; Izumo, S.; Ronquillo, A. T.; Matsumuro, K.; Sato, E.; Osame, M. Cytokine Expression in the Spinal Cord Lesions in HTLV-I-Associated Myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* **1994**, *53* (1), 72–77.
- Valentin, H.; Hamaia, S.; König, S.; Gazzolo, L. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Induced by Human T-Cell Leukaemia Virus Type 1 Tax Protein in T-Cells Stimulates Proliferation of Human T-Lymphocytes. *Journal of General Virology* **2001** *82* (4), 831–835.
- Verdonck, K.; González, E.; Dooren, S. V.; Vandamme, A.-M.; Vanham, G.; Gotuzzo, E. Human T-Lymphotropic Virus 1: Recent Knowledge about an Ancient Infection. *The Lancet Infectious Diseases* **2007**, *7* (4), 266–281.
- Volterra, A.; Meldolesi, J. Astrocytes, from Brain Glue to Communication Elements: The Revolution Continues. *Nat Rev Neurosci* **2005**, *6* (8), 626–640.
- Watanabe T. HTLV-1-associated diseases. *International Journal of Hematology* **1997**; *66*(3):257-278.
- Wu, A.. *Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests, 4th Edition: Saunders Elsevier, St. Louis, MO.* **2006**. Pp 742743.
- Wu, L., Wang, T., Gui, W., Lin, H., Xie, K., Wang, H., ... Hou, L.. Prognostic Significance of Serum Beta-2 Microglobulin in Patients with Non-Hodgkin Lymphoma. *Oncology*, **2014**, *87*(1), 40–47.
- Zhang, D.; Yuan, D.; Shen, J.; Yan, Y.; Gong, C.; Gu, J.; Xue, H.; Qian, Y.; Zhang, W.; He, X.; Yao, L.; Ji, Y.; Shen, A. Up-Regulation of VCAM1 Relates to Neuronal Apoptosis After Intracerebral Hemorrhage in Adult Rats. *Neurochem Res* **2015**, *40* (5), 1042–1052.
- Zhang, M.; Zhang, Z.; Goldman, C. K.; Janik, J.; Waldmann, T. A. Combination Therapy for Adult T-Cell Leukemia-Xenografted Mice: Flavopiridol and Anti-CD25 Monoclonal Antibody. *Blood* **2005**, *105* (3), 1231–1236.

Zhao, T.; Matsuoka, M. HBZ and Its Roles in HTLV-1 Oncogenesis. *Frontiers in Microbiology* **2012**, *3*, 247.

ANEXO

Escala IPEC-2
<p>Escore motor: Marcha ()</p> <ol style="list-style-type: none"> 0. Normal 1. Anormal mas deambula de forma independente 2. Anormal e dependente de suporte unilateral eventual 3. Anormal e dependente de suporte unilateral permanente 4. Anormal e dependente de suporte bilateral eventual 5. Anormal e dependente de suporte bilateral permanente 6. Anormal, dependente de suporte bilateral permanente e uso ocasional de cadeira de rodas (CR) 7. Uso permanente de CR, é capaz de levantar e permanecer em pé sem suporte 8. Uso permanente de CR, usa os braços para se levantar, permanece em pé sem suporte 9. Uso permanente de CR, precisa de ajuda de terceiros para se levantar e permanece em pé com suporte 10. Uso permanente de CR, não consegue se levantar, realiza movimentos voluntários com os membros inferiores quando sentado 11. Uso permanente de CR, não consegue se levantar, não apresenta movimentos voluntários nos membros inferiores
<p>Escore motor: Corrida ()</p> <ol style="list-style-type: none"> 0. Corre 1. Incapaz de correr
<p>Escore motor: Subir escadas ()</p> <ol style="list-style-type: none"> 0. Sobe escadas 1. Sobe escadas somente segurando no corrimão 2. Incapaz de subir escadas
<p>Escore motor: Pular ()</p> <ol style="list-style-type: none"> 0. Pula com um ou dois pés 1. Pula somente com os dois pés 2. Pula somente com suporte para as mãos 3. Incapaz de pular
<p>Escore de espasticidade: Clônus () – Ao apoiar os pés, eles tremem? Se sim, marcar (2)</p> <ol style="list-style-type: none"> 0. Ausente 1. Somente induzido pelo examinador 2. Espontâneo
<p>Escore de espasticidade: Espasmos flexores/extensores () - Suas pernas ficam rígidas, esticando ou dobrando involuntariamente?</p> <ol style="list-style-type: none"> 0. Ausente 1. Presente
<p>Escore sensitivo: Parestesias ()</p> <ol style="list-style-type: none"> 0. Ausente 1. Presente, eventualmente (>2 vezes semana) 2. Presente, permanentemente
<p>Escore sensitivo: Dor lombar ()</p> <ol style="list-style-type: none"> 0. Ausente 1. Presente eventualmente (>2 vezes semana) 2. Presente permanentemente
<p>Escore sensitivo: Dor de membros inferiores ()</p> <ol style="list-style-type: none"> 0. Ausente 1. Presente eventualmente (>2 vezes semana) 2. Presente permanentemente
<p>Escore esfinteriano: Controle vesical ()</p> <ol style="list-style-type: none"> 0. Total 1. Urgência 2. Incontinência ou retenção eventuais 3. Uso permanente de cateter de demora ou uso regular de cateter de alívio
<p>Escore esfinteriano: Continência fecal ()</p> <ol style="list-style-type: none"> 0. Normal 1. Constipação 2. Incontinência ou retenção total com necessidade de extração manual ou enemas
<p>Escore total: ___/31</p>

Anexo – Escala IPEC-2. Estados clínicos: 0 = Normal ou Assintomático; 1-10 = LEVE; 11-21 = MODERADA; 22-31 = GRAVE; Piora ou melhora = Diferença mínima clinicamente relevante de alteração: ± 5 pontos (ou cerca de 15%).