

DENER OLIVEIRA LIMA E FRANÇA

**ESTUDO DO PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA  
INDUÇÃO DE LESÃO DO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL NA INFECÇÃO CAUSADA PELO HTLV-1**



**Monografia apresentado 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  
DEZEMBRO / 2019

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

### CIP - Catalogação na Publicação

F814e França, Dener Oliveira Lima  
Estudo do papel dos macrófagos na indução de lesão do sistema nervoso central na infecção causada pelo HTLV-1 / Dener Oliveira Lima França. -- Rio de Janeiro, 2019.  
66 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, 2019.

1. HTLV-1. 2. Mielopatia Associada à infecção pelo HTLV-1. 3. Macrófagos. 4. Sistema nervoso central. 5. Camundongos. 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: Dener Oliveira Lima e França**  
DRE: 116041065

**BANCA EXAMINADORA:** Profa. Iranaia Assunção Miranda (Presidente)  
Dr. Otávio de Melo Espindola  
Dra. Ana Carolina de Siqueira Couto de Oliveira  
Prof. Anderson Guimarães Baptista Costa (Suplente)

**Título da Monografia: “Estudo do papel dos macrófagos na indução de lesão do sistema nervoso central na infecção causada pelo HTLV-1”**

**Local: Sala I2-52 Sala de reunião do Departamento de Imunologia / IMPPG / CCS / UFRJ**  
**Data e hora de início: 12 de dezembro de 2019 às 10:00h**

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 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 12 de ~~DEZEMBRO~~ DEZEMBRO de 2019.

NOTA

Banca Examinadora:

10,0

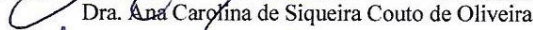
\_\_\_\_\_  
Profa. Iranaia Assunção Miranda



Dr. Otavio de Melo Espindola

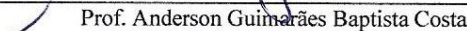
10,0

\_\_\_\_\_  
Dra. Ana Carolina de Siqueira Couto de Oliveira

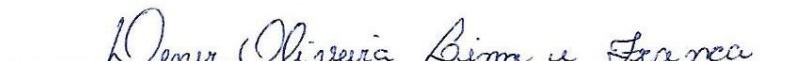


10,0

\_\_\_\_\_  
Prof. Anderson Guimarães Baptista Costa



Aluno:



Dener Oliveira Lima e França

Orientador:



Profa. Juliana Echevarria Lima

Coordenador  
de TCC



Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marcos, Aline e Jefferson, que com muito amor e esforço se dedicaram para me proporcionar a melhor educação possível. Eles sempre apoiaram os meus estudos e permaneceram ao meu lado até mesmo em momentos ruins, sempre me incentivando a seguir em frente. O apoio que recebi foi fundamental para eu chegar aonde eu cheguei. Amo muito vocês! Obrigado por tudo, que eu possa retribuir sempre tudo de maravilhoso que vocês já fizeram por mim.

Agradeço aos meus familiares, por sempre estarem dispostos a me ajudar caso eu precisasse. Todos sempre deram maior apoio e incentivo. Alguns até hoje estou tentando reconquistar porque faltei algum evento importante por causa dos trabalhos de faculdade rs. Agradeço aos meus avós, que sempre permaneceram presente e interessados sobre como estavam indo os estudos na universidade. Obrigado por todo carinho e amor!

Quero agradecer a minha orientadora, Professora Juliana Echevarria por todo apoio e incentivo ao longo dessa carreira acadêmica. Antes de pedir estágio eu morria de medo de entrar em um laboratório com aqueles orientadores que nem sabem quem são os alunos de IC do laboratório. Ainda bem que isso não aconteceu! A professora Juliana se preocupa com cada aluno e ainda se dispõem a sair do fundão as oito horas da noite para ajudar em alguns experimentos de bancada. Não são todos os orientadores que tratam os alunos como se fossem seus próprios filhos. Obrigado pelos conselhos, pelas críticas, por ter me ajudado a crescer como cientista e como pessoa e por ter sido uma ótima orientadora nesses 3 anos. Obrigado por todas as oportunidades, pela orientação, suporte na elaboração de trabalhos e pelo conhecimento transmitido no dia a dia.

Gostaria de agradecer a Thaís Oliveira que foi a pessoa que acompanhei assim que entrei no laboratório. Além de ganhar uma ótima companheira de trabalho eu também ganhei uma amiga. As coisas teriam sido mais difíceis se não fosse ela ao meu lado me dando apoio e me incentivando a continuar. Quero te agradecer por ter sido uma ótima amiga e pelos conselhos que você me deu. Obrigado por ter ficado várias vezes até tarde no fundão me ajudando com os experimentos com a hBMEC. Obrigado por todo o carinho e amor durante esse período. Você foi um presente para mim e espero poder levar nossa amizade para a vida toda. Conte sempre comigo!

Agradeço a Sabrina Maciel por ter ficado ao meu lado neste último ano de graduação. Sem a sua amizade com certeza eu já teria enlouquecido. Muito obrigado por me ajudar nos experimentos, por me ouvir em momentos de desabafo e por me fazer companhia. Em alguns

momentos, apenas a sua presença ao meu lado foi o suficiente para melhorar um dia ruim. Gostaria de fazer um agradecimento especial a todas as canetas que você me emprestou durante esses meses de experimento. Você foi um dos maiores presentes que o laboratório me deu e vou levar sua amizade para a vida inteira. Muito obrigado por tudo e conte sempre comigo!

Gostaria de agradecer aos amigos que fiz na UFRJ, principalmente a Beatriz Caroline e ao Michel Leon. Conheci a Beatriz na fila para a matrícula, foi a primeira pessoa da minha turma que eu tive contato e somos amigos desde essa época. Nós passamos juntos por muitos altos e baixos durante a graduação e sou muito grato por ter tido a sua companhia em todos os trabalhos em grupo, todas as aulas e todos os dias. Muito obrigado por tudo! Gostaria de agradecer ao Michel por ter sido meu melhor amigo. Passamos por muitas situações juntos e nos tornamos irmãos. Você foi uma das pessoas que mais me ajudou durante esses anos e vou levar sua amizade para sempre no meu coração. Muito obrigado pela companhia, conselhos e por ter dividido sua vida comigo. Obrigado pela sua amizade!

Gostaria de agradecer ao Thiago Silva por todo esse tempo que nos conhecemos. Você foi extremamente importante durante o meu período de graduação e me ajudou diversas vezes com experimentos no laboratório. Agradeço por você ter ficado vários dias até às 22:00 me esperando para não deixar eu ir sozinho para avenida Brasil. Muito obrigado pela companhia e por ser a pessoa maravilhosa que você é. Obrigado por ouvir meus desabafos, pelo apoio em dias difíceis e por dividir sua vida comigo. Além de me ajudar com os experimentos você também me ajudou bastante na vida pessoal. Tive muita sorte de ter conhecido você. Muito obrigado por tudo!

Gostaria de agradecer a Professora Patrícia Garcez por ter aceitado a colaboração. Se não fosse por ela esse trabalho não poderia ter sido realizado. Obrigado pela confiança e apoio.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, ao Instituto de Microbiologia, seu corpo docente e administrativo. Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, FAPERJ pelo apoio financeiro. E a todos que contribuíram para minha formação, seja direta ou indiretamente, o meu muito obrigado!

## RESUMO

DENER OLIVEIRA LIMA E FRANÇA

### ESTUDO DO PAPEL DOS MACRÓFAGOS NA INDUÇÃO DE LESÃO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL NA INFECCÃO CAUSADA PELO 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 para a célula T humana do tipo 1 (HTLV-1) é o agente etiológico da mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (MAH/PET). O vírus também está associado com aparecimento de outras doenças em humanos, como por exemplo, a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL), artrite e uveíte. A MAH/PET é uma doença inflamatória crônica e neurodegenerativa caracterizada por danos no sistema nervoso central (SNC) com perda da bainha de mielina (desmielinização), perda axonal e gliose. Essa doença inflamatória depende da desregulação da barreira hematoencefálica (BHE) e da infiltração de leucócitos ativados e/ou infectados para a medula espinhal. Estudos já demonstraram que células T e B, células dendríticas, macrófagos e monócitos são infectados pelo vírus. Entretanto, pouco se sabe a respeito do papel dos macrófagos durante o desencadeamento da MAH/PET. Assim, nos propomos a caracterizar o perfil fenotípico e funcional de macrófagos murinos cultivados na presença de células infectadas pelo HTLV-1, como também investigar se esses macrófagos podem causar algum efeito deletério às células neurais da medula espinhal através de modelos *in vitro* utilizando culturas organotípicas obtidas de camundongos. Nossos resultados sugerem que macrófagos peritoneais residentes, após o cocultivo com as células permanentemente infectadas pelo HTLV-1 (MT-2), apresentam morfologia característica de ativação celular, diferente do observado em macrófagos controle. Além disso, esses macrófagos apresentam maior expressão do complexo principal de histocompatibilidade tipo II (MHC-II) e da molécula co-estimuladora CD80, bem como, produzem mais espécies reativas de oxigênio, secretam citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e não apresentam diferenças na capacidade fagocítica. Os macrófagos também liberam filamentos compostos por DNA dupla-fita. Todos esses eventos acontecem sem o comprometimento da viabilidade desses macrófagos. Os resultados obtidos através de microscopia confocal de fluorescência sugerem que esses macrófagos, após o cocultivo com células MT-2 (MØ/MT-2), induzem lesão sobre explantes murinos de medula espinhal e esse efeito parece ser mais deletério na porção torácica da medula. Em conclusão, essas descobertas sugerem que os macrófagos podem estar sendo ativados quando em contato com linfócitos T CD4 HTLV-1<sup>+</sup>. A presença desses macrófagos no SNC pode contribuir para o aparecimento e/ou progressão de doença neurológica nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 e conseqüentemente acabam induzindo lesão na medula espinhal devido a secreção de moléculas pró-inflamatórias.

**Palavras-chave: HTLV-1, MAH/PET, macrófagos, SNC, camundongos.**

## ABSTRACT

DENER OLIVEIRA LIMA E FRANÇA

### STUDY OF THE ROLE OF MACROPHAGES IN THE INJURY INDUCTION OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM IN THE INFECTION CAUSED BY HTLV-1

Orientadora: 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-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is the etiologic agent of associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). This virus is also associated with other diseases in humans, such as adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), arthritis and uveitis. HAM/TSP is a chronic, inflammatory and neurodegenerative disease characterized by damage in the central nervous system, with myelin sheath loss (demyelination), axonal and gliosis. This inflammatory disease depends on deregulation of the blood-brain barrier (BBB) and the infiltration of activated leucocytes and/or infected cells to the spinal cord. Studies have shown that T and B cells, dendritic cells, macrophages and monocytes can be infected by this virus. However, little is known about the role of macrophages during HAM/TSP development. Here we, characterize the phenotypic and functional profile of murine macrophages cocultured with HTLV-1 infected cells, as well as to investigate if these macrophages can induce damage to the neural cells in the spinal cord through *in vitro* models, using mouse organotypic culture. Our results suggest that peritoneal macrophages, after co-cultivation with cells permanently infected by HTLV-1 (MT-2), present characteristic cell activation morphology, different from that observed in control macrophages. In addition, the presence of these macrophages/cells increases the expression of Major Histocompatibility Complex type II (MHC-II) and the costimulatory molecule CD80. Also, the cells were capable of producing more reactive oxygen species (ROS), secrete pro-inflammatory cytokine, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . It was also shown that there was no difference in the phagocytic capacity of these cells. Macrophages also released filament composed by double stranded DNA filaments. All of these events happened without macrophages viability commitment. The results obtained on the confocal fluorescence microscope suggested that these macrophages, after the coculture with MT-2 cells, induced damage on murine explants from spinal cord and this effect seems more deleterious on the thoracic portion. In conclusion, these findings suggest that macrophages can exhibit an activated profile when in contact with HTLV-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> lymphocytes. The presence of these macrophages in the CNS may contribute to the occurrence and/or progression of neurological disease in HTLV-1 infected individuals and, consequently, induce spinal cord injury due to secretion of proinflammatory molecules.

**Key-words: HTLV-1, HAM/TSP, macrophages, CNS, mouse.**



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Classificação de vírus segundo Baltimore	<b>01</b>
<b>Figura 2.</b> Representação da estrutura e composição do HTLV-1	<b>04</b>
<b>Figura 3.</b> Representação do genoma do HTLV-1	<b>05</b>
<b>Figura 4.</b> Esquema representativo do ciclo de replicação do HTLV-1	<b>06</b>
<b>Figura 5.</b> Distribuição mundial do HTLV-1	<b>07</b>
<b>Figura 6.</b> Representação de prevalência da infecção pelo HTLV-1 em regiões do Brasil	<b>08</b>
<b>Figura 7.</b> Modelos de quebra de barreira da mucosa na infecção pelo HTLV-1	<b>10</b>
<b>Figura 8.</b> Transmissão do HTLV-1 por contato célula-célula	<b>11</b>
<b>Figura 9.</b> Esquema da sinapse virológica	<b>12</b>
<b>Figura 10.</b> Ressonância magnética da medula espinhal de paciente com MAH/PET	<b>14</b>
<b>Figura 11.</b> Representação esquemática do curso clínico da MAH/PET	<b>15</b>
<b>Figura 12.</b> Modelo representativo do desenvolvimento da MAH/PET	<b>17</b>
<b>Figura 13.</b> Cultivo primário de células do cérebro murinho	<b>21</b>
<b>Figura 14.</b> Análise morfológica da cultura de MØ/MT-2	<b>28</b>
<b>Figura 15.</b> Análise da expressão de CD80 e MHC-II por citometria de fluxo	<b>30</b>
<b>Figura 16.</b> Análise da viabilidade da cultura de MØ/MT-2	<b>31</b>
<b>Figura 17.</b> Detecção de espécies reativas de oxigênio da cultura de MØ/MT-2	<b>32</b>
<b>Figura 18.</b> Ensaio de fagocitose de MØ/MT-2	<b>33</b>
<b>Figura 19.</b> Quantificação de TNF- $\alpha$ e IL-1 $\beta$ no sobrenadante da cultura de MØ/MT-2	<b>33</b>
<b>Figura 20.</b> Detecção de DNA dupla-fita no sobrenadante da cocultura de MØ/MT-2	<b>34</b>
<b>Figura 21.</b> Análise do cocultivo dos explantes neurais embrionários com MØ/MT-2	<b>35</b>
<b>Figura 22.</b> Análise da viabilidade de explantes neurais cocultivadas com MØ/MT-2	<b>36</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ATL** - Leucemia de células T do adulto
- ATLL** – Leucemia/linfoma de células T do adulto
- BHE** - barreira hematoencefálica
- CD** - Cluster de Diferenciação
- CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CXCL** - quimiocina (*Chemokine (C-X-C motif) ligand*)
- DC** - Célula dendrítica
- DMSO** - Dimetilsulfóxido
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- dsDNA** - Dupla fita de ácido desoxirribonucleico
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ERO** - Espécie reativa de oxigênio
- GLUT-1** - Transportador de glicose 1
- GP** - Glicoproteína
- Gy** - Gray
- HIV** - Vírus da imunodeficiência humana
- HSPG** - Proteoglicanos de heparan sulfato
- HTLV-1** - Vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1
- ICAM-1** - Molécula de adesão intercelular I
- ICTV** - Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
- IFN- $\gamma$**  - Interferon gama
- IL** - Interleucina
- IN** - Integrase
- LDH** - Lactato desidrogenase

**LFA-1** - Antígeno 1 associado à função dos linfócitos

**LTR** - Repetição terminal longa (*Long Terminal Repeats*)

**MAH/PET** - Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical

**MCP1** - Proteína-1 quimioatraente de monócitos

**MHC-II** - Complexo principal de histocompatibilidade do tipo II

**MMP** – Matrix metalloproteinase

**MØ** - Macrófago

**MØ/Li** - macrófago cocultivado com linfócitos

**MØ/MT-2** - macrófago cocultivado com as células MT-2

**mRNA** - RNA mensageiro

**NCI-NIH** - *National Cancer Institute - National Institutes of Health*

**NO** - Óxido nítrico

**NRP-1** - Receptor de neuropilina-1

**ORF** - Sequências de leitura aberta (*Open Reading Frames*)

**PMA** - Phorbol 12-myristate 13-acetate

**PR** - Protease

**RNA** - Ácido ribonucleico

**RNase** - Ribonuclease

**SFB** - Soro fetal bovino

**SNC** - Sistema nervoso central

**ssRNA** - fita simples de ácido ribonucleico

**TNF- $\alpha$**  - fator de necrose tumoral-alfa

**TR** - Transcriptase reversa

**tRNA** - RNA transportador

**Tuj-1** - Beta-tubulina classe III específica para neurônios

**V-CAM** - Proteína de adesão celular vascular (*Vascular cell adhesion protein*)

**VEGF** - Fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor*)

**VLA- 4** - integrina  $\alpha 4\beta 1$  (*Very Late Antigen-4*)

**ZO** - Zonula occludens

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Vírus.....	1
1.2 Vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1).....	2
1.2.1 Propriedades gerais.....	3
1.2.2 Replicação viral.....	5
1.2.3 Epidemiologia do HTLV-1 no Brasil e no mundo.....	7
1.2.4 Transmissão.....	8
1.2.5 Doenças associadas à infecção pelo HTLV-1.....	12
1.2.5.1 Mielopatia associada ao HTLV-1.....	13
1.3 Resposta imunológica durante a infecção e desencadeamento da MAH/PET.....	15
1.4 Macrófagos e a MAH/PET.....	18
1.5 Modelos alternativos para estudar o SNC.....	19
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS .....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. METODOLOGIA.....	22
4.1 Cultura de células.....	22
4.2 Animais.....	23
4.3 Lavado Peritoneal.....	23
4.4 Obtenção de linfócitos murinos.....	23
4.5 Explantes neurais.....	23
4.6 Cocultura.....	24
4.7 Imunofenotipagem.....	24
4.8 Microscopia de Fluorescência.....	25
4.9 Análise da viabilidade (MTT).....	25
4.10 Análise da viabilidade celular (LDH).....	26
4.11 Quantificação de citocinas por ELISA.....	26
4.12 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	27
4.13 Ensaio de quantificação de dsDNA.....	27
4.14 Ensaio de Fagocitose.....	27
4.15 Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS.....	28

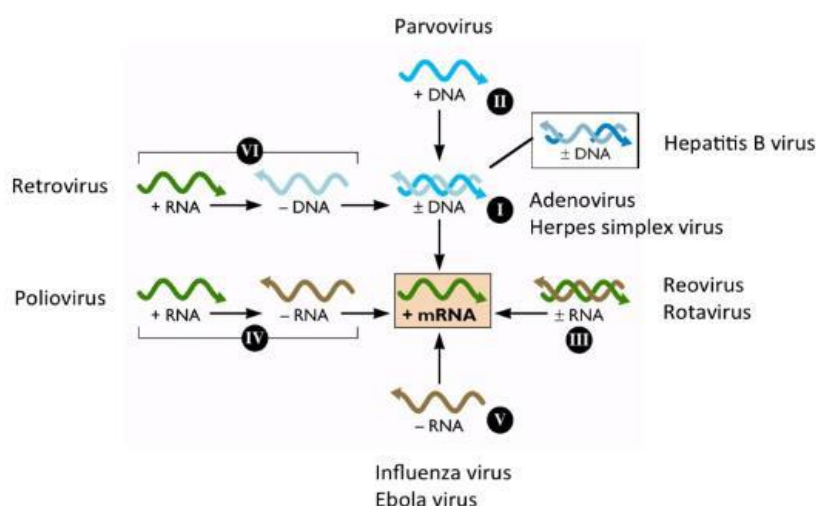
5.1 A presença de células MT-2 na cultura altera a morfologia de macrófagos peritoneais.....	28
5.2 O cocultivo de macrófagos peritoneais com as células MT-2 promove alteração na expressão de MHC e CD80 .....	29
5.3 O cocultivo de macrófagos peritoneais com as células MT-2 não altera viabilidade celular.....	31
5.4 A presença células MT-2 na cultura modifica a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) dos macrófagos .....	32
5.5 O cocultivo de macrófagos peritoneais com as células MT-2 não altera a capacidade fagocítica .....	32
5.6 A presença células MT-2 na cultura induz a produção de citocinas por macrófagos .....	33
5.7 Macrófagos cocultivados com a MT-2 são capazes de liberar redes extracelulares de DNA.....	34
5.8 Efeito do cocultivo de MØ/MT-2 com explantes de medula espinhal .....	35
5.9 Efeito do cocultivo de MØ/MT-2 sobre a viabilidade da cultura de células neurais.....	36
6. DISCUSSÃO .....	37
7. CONCLUSÃO .....	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	43

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Vírus

Os vírus são entidades biológicas que apresentam ciclo de replicação obrigatoriamente intracelular e não apresentam metabolismo quando fora da célula hospedeira. A partícula viral possui um material genético formado de ácidos nucleicos (RNA ou DNA), envolto por uma capa proteica (capsídeo), podendo conter ou não envelope lipídico (Santos, Romanos e Wigg, 2015). Os primeiros registros de manifestações clínicas associadas às infecções virais são de 3.700 a.C. oriundos de um hieróglifo de Mênfis, capital do Egito antigo, onde estavam descritos os sintomas característicos da poliomielite paralítica em um Sacerdote do templo Ruma (Cann, 2016).

Inicialmente, os vírus eram classificados de acordo com a síntese viral do RNA mensageiro (mRNA), conforme a classificação desenvolvida por David Baltimore. Dessa forma, os vírus foram agrupados em sete classes distintas levando em consideração o genoma e a replicação do material genético (**Figura 1**) (Baltimore, 1971). O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus “*International Committee on Taxonomy of Viruses*” (ICTV) atualizou a classificação, elaborando uma taxonomia exclusiva para os vírus, utilizando parâmetros como: natureza do material genético, simetria do capsídeo, presença ou ausência de envelope lipídico, dimensão do vírus, bem como a susceptibilidade a agentes químicos (<http://www.ictvonline.org>).



**Figura 1. Classificação de vírus segundo Baltimore.** Definição de sete grupos de vírus, com base na característica do material genético e na forma como este genoma é transcrito a mRNA: vírus apresentam (I) cadeia dupla de DNA, (II) cadeia simples de DNA, (III) cadeia dupla de RNA, (IV) cadeia simples positiva de RNA, (V) cadeia simples negativa de RNA, (VI) cadeia simples de RNA com intermediário de DNA e (VII) cadeia dupla de DNA com intermediário de RNA (Figura adaptada de <http://www.virology.ws/2009/08/12/simplifying-virus-classification-the-baltimore-system/>).

De acordo com a classificação de Baltimore, os retrovírus, vírus pertencentes ao grupo VI, possuem material genético formado por RNA fita simples, que forma DNA como intermediário (Baltimore, 1971). Durante a replicação dos retrovírus, a enzima transcriptase reversa sintetiza um DNA intermediário a partir da fita de RNA. Eles podem ser encontrados em todas as classes de animais vertebrados, incluindo peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Além disso, esses vírus são capazes de causar diferentes doenças em humanos como é o caso do Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (HIV-1) e do Vírus Linfotrópico para Células T Humanas do Tipo 1 (HTLV-1) (Carter e Saunders, 2007).

### **1.2 Vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)**

Por vários anos, os pesquisadores dedicaram-se a demonstrar a existência de retrovírus causadores de neoplasias em humanos, uma vez que tal fato já havia sido relatado em primatas não humanos e outros animais. Gallo e colaboradores direcionaram seus estudos para pesquisas relacionadas a retrovírus em animais, no *National Cancer Institute - National Institutes of Health* (NCI-NIH). No final da década de 1970, seu grupo descreveu o primeiro retrovírus capaz de gerar neoplasia em humanos, a partir do isolamento e identificação do HTLV-1 (Poiesz *et al.*, 1980; Gallo, 2005). O HTLV-1 foi isolado de amostras provenientes do sangue periférico e do fragmento de linfonodo oriundos de um paciente com 28 anos, que foi diagnosticado com linfoma cutâneo de células T e tratado no NCI/NIH. Os linfócitos T foram mantidos em cultura na presença da citocina interleucina 2 (IL-2), originando uma linhagem de células imortalizadas. Essa linhagem recebeu o nome de HUT-102 e nela foram detectadas partículas virais e a presença da enzima transcriptase reversa (Poiesz *et al.*, 1980). Nessa mesma época partículas do HTLV-1 também foram identificadas no Japão em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com leucemia de células T do adulto (ATL), confirmando a associação entre a infecção por HTLV-1 e o desenvolvimento de neoplasias (Poiesz *et al.*, 1980; Osame *et al.*, 1980 *apud* Osame, 2002).

A princípio o vírus foi então chamado de *Human cutaneous T-cell Lymphoma Virus* (HTLV) (Poiesz *et al.*, 1980). Entretanto, com o passar dos anos, descobriu-se que o HTLV-1 não causava somente linfoma, sendo por isso o nome alterado de *Lymphoma* para *Lymphotropic*. Dessa forma, o retrovírus passou a ser chamado de *Human T-cell Lymphotropic Virus* (Coffin, 2015). Além do HTLV-1, também já foram descritos os retrovírus: HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4. Contudo, o HTLV-1 continua sendo o mais estudado, devido à sua prevalência e importância clínica (Nicola, Ambrosioni e Paredes, 2015). O HTLV-2, que infecta preferencialmente células T auxiliares (CD4<sup>+</sup>), foi identificado a partir do sangue de um



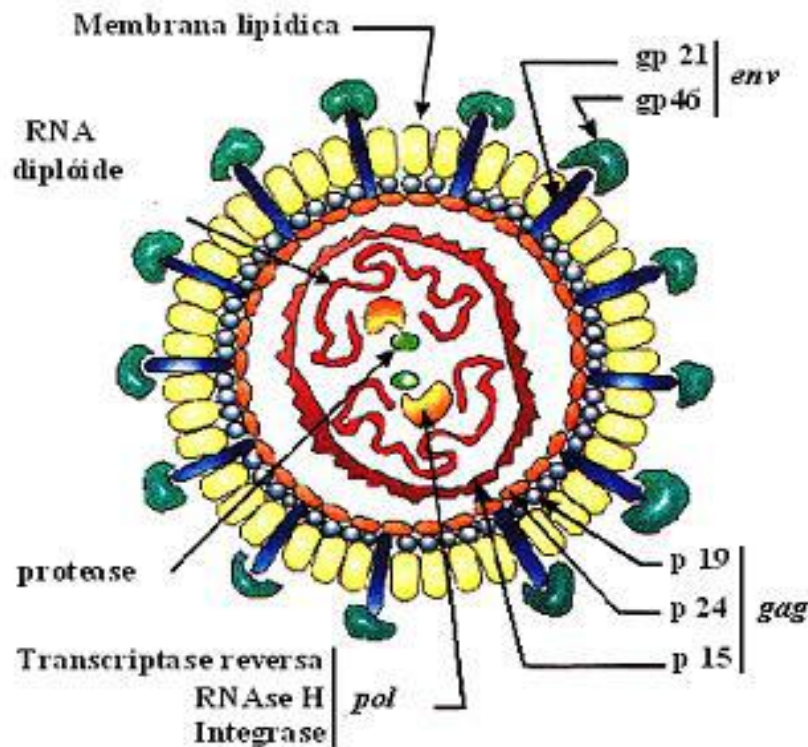
paciente com leucemia de células pilosas e apresenta identidade de 66% com o genoma do HTLV-1. No entanto, até o presente momento, nenhuma doença foi associada à infecção por esse vírus (Vrieland H *et al.*, 2004).

### 1.2.1 Propriedades gerais

O HTLV-1 é um retrovírus pertencente à ordem *Ortervirales*, família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Deltaretrovirus* (ICTV, 2018). O vírus apresenta sete genótipos, sendo quatro principais genótipos: 1a, cosmopolita; 1b, África central; 1c, Australo-melanésia; 1d, África central/Pigmeus; e três raros descritos na África central (1e, 1f e 1g) (Vandamme *et al.*, 1998; Wolfe *et al.*, 2005). O subtipo cosmopolita é dividido em cinco subtipos: Transcontinental (A), Japonês (B), África Ocidental/Caribe (C), Norte da África (D), e Negros do Peru (E) (Van Dooren *et al.*, 1998; Kashima *et al.*, 2006).

O HTLV-1 é um vírus envelopado de 100 a 140 nm de diâmetro e que apresenta proteínas transmembranares. Além disso, o vírus possui uma região central denominada *core*, medindo 80 a 100 nm, composta pelo nucleocapsídeo. Nessa região, encontra-se o genoma viral, composto por duas fitas simples de RNA de polaridade positiva, e as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (**Figura 2**) (Tangy, 1996).

O HTLV-1 possui genes *gag* (que codifica proteínas de matriz, capsídeo e proteínas associadas a nucleocapsídeo), *pol* (que codifica a RNase, protease, endonuclease e a transcriptase reversa) e *env* (que codifica as proteínas do envelope – gp46 e a gp21) flanqueados por segmentos LTR (*Long Terminal Repeats*) (Seiki *et al.*, 1983).



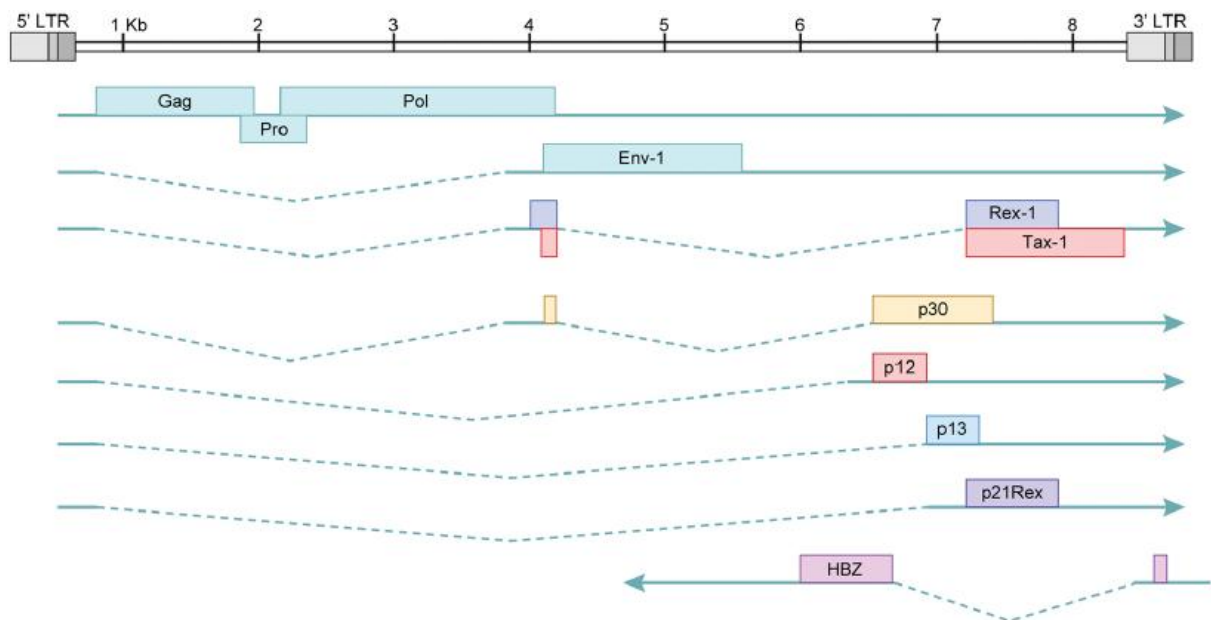
**Figura 2. Representação da estrutura e composição do HTLV-1.** Partícula completa do HTLV-1 composta pela membrana lipídica (envelope) onde estão inseridas glicoproteínas de superfície (gp46) e transmembrana (gp21). O core é constituído pelo nucleocapsídeo que contém no seu interior o material genético, associadas a enzima transcriptase reversa e protease. Os genes *gag* (Proteínas do core), *env* (Glicoproteína gp46 e gp21), *pol* (Transcriptase reversa, RNase H, endonuclease e protease) codificam proteínas estruturais e enzimas típicas de retrovírus (Adaptado de Tangy, 1996).

O HTLV-1 possui uma região denominada *pX*, posicionada entre *env* e a extremidade 3' LTR, que codifica 4 seqüências de leitura aberta (*open reading frames*, ORF) que se sobrepõem. Pré-mRNAs codificados pela região *pX* sofrem *splicing* alternativo em regiões distintas, promovendo a transcrição da ORF I, ORF II, ORF III e ORF IV, que origina mRNAs para proteínas reguladoras e não estruturais, tais como Tax, Rex, p12, p21, p30, p13 e HBZ (**Figura 3**) (Seiki *et al.*, 1983).

A ORF I codifica para a proteína p12, cuja clivagem na região amino-terminal origina a proteína p8. Entretanto, o funcionamento desse mecanismo ainda não foi bem elucidado (Koralnik *et al.*, 1993). Já se tem descrito que, em células infectadas pelo HTLV-1, a proteína p12 se localiza em algumas regiões específicas no espaço intracelular, como no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi (Inoue *et al.*, 1987). Além disso, essa proteína é essencial para infectar os linfócitos T primários e células dendríticas, possuindo um importante papel na disseminação do vírus (Albrecht *et al.*, 2000; Valeri *et al.*, 2010).

O *splicing* alternativo da ORF II produz mRNA para síntese das proteínas p13 e p30. Já as ORF III e IV produzem a proteína reguladora Rex e a proteína Tax, respectivamente. Por sua

vez a proteína HBZ (*HTLV 1 basic zipper factor*) é sintetizada a partir da tradução de um mRNA antisense transcrito a partir da região 3' LTR (Edwards *et al.*, 2011). As proteínas Tax e HBZ são importantes na regulação da transcrição viral, bem como podem interagir com diversas proteínas do hospedeiro, ativando ou suprimindo algumas funções celulares (Olière *et al.*, 2011). A proteína viral Tax é conhecida por ser ativadora da via NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição envolvido na ativação e proliferação de linfócitos T em resposta a diferentes estímulos. Por outro lado, a HBZ inibe a via clássica de ativação de NF- $\kappa$ B (Zhi *et al.*, 2011). Pacientes infectados pelo HTLV-1 com Leucemia/Linfoma de células T do Adulto possuem a via de NF- $\kappa$ B continuamente ativada, podendo causar a desregulação de vários genes que codificam para citocinas, receptores de citocinas, proto-oncogenes e proteínas anti-apoptóticas (Hiscott *et al.*, 2006). A proteína Tax também é capaz de inibir a morte por apoptose, reparo de DNA e os *checkpoints* do ciclo celular (Mühleisen *et al.*, 2014).

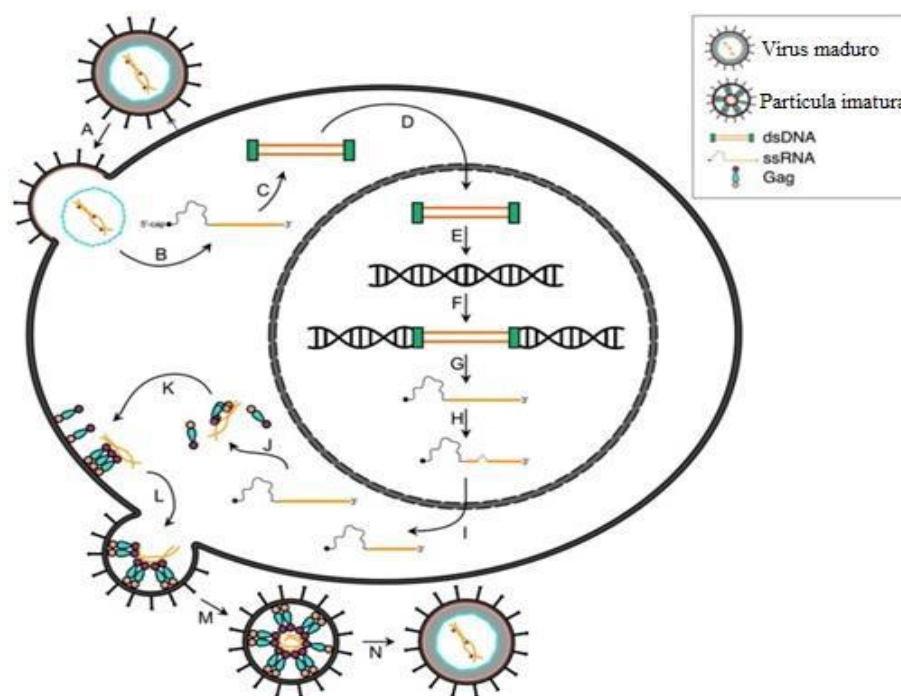


**Figura 3. Representação do genoma do HTLV-1.** Genes *gag*, *pol* e *env* se encontram flanqueados por segmentos LTR (*Long Terminal Repeat*). A região entre *env* e 3' LTR sofrer *splicing* em regiões distintas dando origem a quatro ORFs distintas. Esse processo resulta na síntese de proteínas reguladoras e acessórias como: Tax, Rex, p21, p12, p13, p30 e HBZ (gene antisense) (Figura adaptada de Martinez *et al.*, 2019).

### 1.2.2 Replicação viral

O HTLV-1 infecta preferencialmente linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Prince *et al.*, 1994). As células T CD8<sup>+</sup>, linfócitos B e células mielóides, como macrófagos e monócitos, também são infectados pelo HTLV-1, em menor número (Franchini *et al.*, 1985; Koyanagi *et al.*, 1993; Cho *et al.*, 1995). Ainda não se sabe como ocorre o processo de adsorção do HTLV-1 nas células hospedeiras. No entanto, foi proposto que as proteínas virais gp46 e gp21, presentes na superfície do envelope lipídico, se ligariam a alguns receptores da célula hospedeira (Hoshino, 2012).

Estudos sugerem que três proteínas presentes na superfície das células hospedeiras podem funcionar como receptores para o HTLV-1: transportador de glicose 1 (GLUT-1), receptor de neuropilina-1 (NRP-1) e proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG) (Manel *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2005; Ghez *et al.*, 2006). Já foi demonstrado que a proteína viral gp46 interage com o heterodímero formado pela interação de NRP-1 com HSPG. A interação acontece porque a proteína viral mimetiza o ligante fisiológico do NRP-1, o VEGF. Por sua vez, a infecção de novas células é inibida com a adição exógena de VEGF (Lambert *et al.*, 2009). A interação entre gp46 e NRP-1 causa uma mudança conformacional na gp46, possibilitando que esta proteína se ligue à GLUT-1. A interação entre essas duas proteínas possibilita a fusão mediada por gp21 entre o envelope viral e a membrana celular, o que permite a liberação do genoma viral no citoplasma (Jones *et al.*, 2011). Em seguida, o RNA é transcrito em DNA de fita dupla pela ação da transcriptase reversa. Esse DNA é transportado para dentro do núcleo e inserido no DNA da célula pela integrase viral. A integração do genoma de HTLV-1 no DNA celular não ocorre em locais específicos. No entanto, ocorre em regiões de transcrição ativa, ricas em AT (Gillet *et al.*, 2011). O provírus integrado pode ser transcrito e traduzido, gerando assim novas proteínas para a formação de partículas virais (**Figura 4**) (Olière *et al.*, 2011).

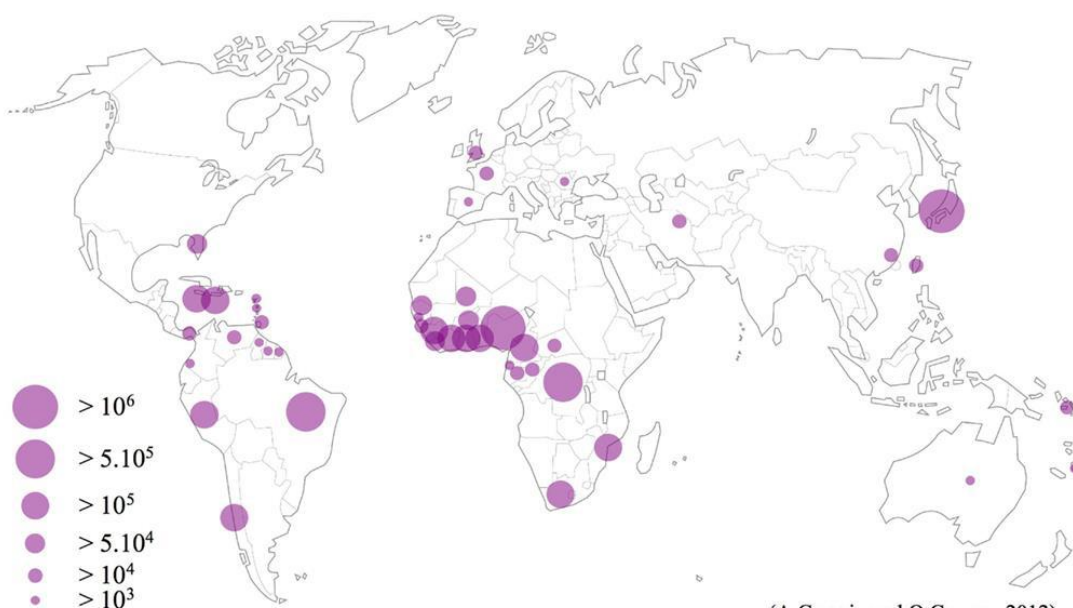


**Figura 4. Esquema representativo do ciclo de replicação do HTLV-1.** Fusão do envelope de HTLV-1 com a membrana da célula através da interação dos receptores GLUT1, HSPG e NRP-1 com a proteína de superfície viral gp46/gp21. (A) Após a fusão, o RNA viral é liberado no citoplasma (B), sendo transcrito em DNA de fita dupla (dsDNA) por ação da enzima viral transcriptase reversa (C). O dsDNA é transportado para o núcleo (D), onde é integrado ao DNA da célula (E, F). O provírus é então transcrito pela RNA polimerase II da célula (G), e os mRNAs virais sofrem modificações pós-transcricionais (H). Os mRNAs virais são transportados do núcleo para

o citoplasma (I), e as proteínas do vírus são sintetizadas pela maquinaria da célula infectada (J). As proteínas Gag, Gag-Pol e Env são transportadas para a membrana plasmática, juntamente com as duas cópias do RNA viral (K). O RNA e as proteínas virais se associam próximo à membrana da célula, induzindo a formação da partícula viral imatura (L). A partícula é liberada a partir da superfície da célula por brotamento (M) e passa por um processo de maturação através da ação da protease viral, que cliva as poliproteínas virais para formar uma partícula viral madura e infecciosa (N) (Adaptado de Martin *et al.*, 2016).

### 1.2.3 Epidemiologia do HTLV-1 no Brasil e no mundo

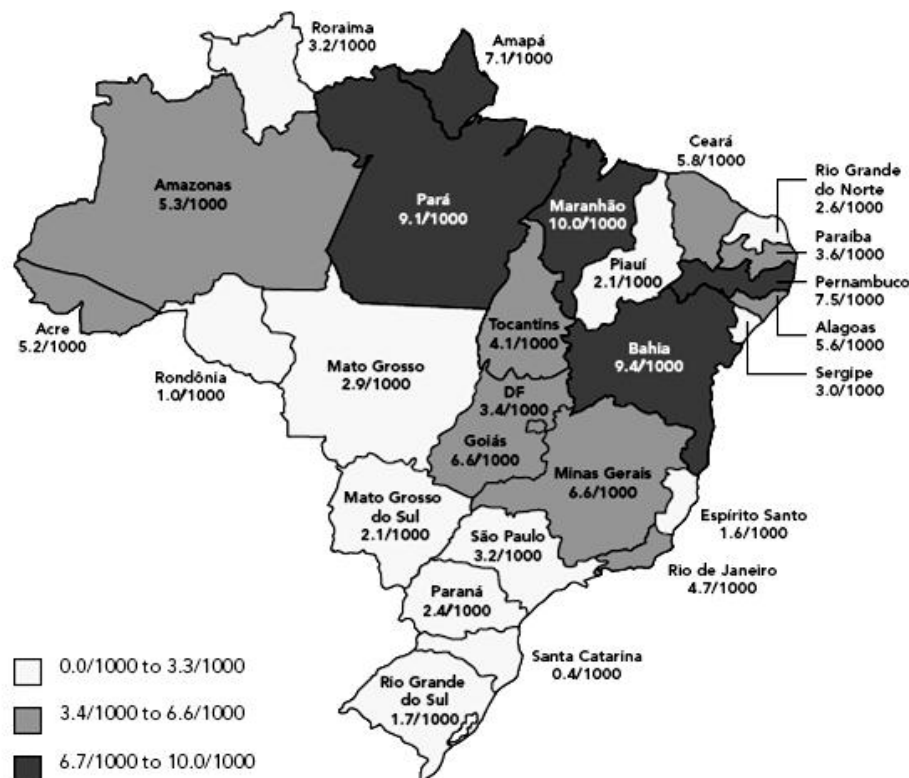
De acordo com Gessain e Cassar (2012), estima-se que, entre 5 e 10 milhões de pessoas no mundo sejam portadoras do HTLV-1. Dados epidemiológicos demonstraram que as áreas com maior distribuição geográfica do vírus são: África, Américas do Sul e Central, as Ilhas Caribenhas e o Japão (Gessain e Cassar, 2012) (**Figura 5**). Contudo, esses autores constataram que a maior parte dos dados eram obtidos de regiões endêmicas para o HTLV-1. Como indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanecem muitos anos sem apresentar sintomas, é difícil determinar o número preciso de pessoas infectadas. Então, mesmo nas regiões onde a prevalência do HTLV-1 é bem descrita, são poucos os estudos baseados na população geral, sendo a maior parte dos dados provenientes de estudos com indivíduos doadores de bancos de sangue. Por esse motivo, a prevalência do HTLV-1 ainda é desconhecida para 80% da população mundial (Hlela *et al.*, 2009).



**Figura 5. Distribuição mundial do HTLV-1.** O mapa apresenta as regiões com maior prevalência de pessoas infectadas com HTLV-1. Os círculos mostram o número estimado de indivíduos infectados pelo HTLV-1, ou seja, quanto maior o círculo maior o número de indivíduos infectados. (Figura adaptada de Gessain e Cassar, 2012).

Estima-se que os países com o maior número de pessoas infectadas pelo HTLV-1 sejam o Japão e o Brasil, cada um com mais de 1 milhão de indivíduos. Estudos epidemiológicos realizados a partir de dados obtidos de amostras de doadores de sangue, de diferentes regiões do Brasil, apontam que cerca de 60 mil indivíduos são afetados por doenças associadas à

infecção viral (Carneiro-Proiett *et al.*, 2002). Entretanto, a prevalência do HTLV-1 no Brasil varia de acordo com as regiões (**Figura 6**). Na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, a prevalência entre imigrantes japoneses é considerada alta, atingindo 6,8% (Bandeira *et al.*, 2015). Em Salvador, Bahia, o estudo realizado em população geral demonstrou uma prevalência de 1,7% de indivíduos infectados, e estudos feitos a partir de amostras de gestantes apontaram uma prevalência de 1,05% (Dourado *et al.*, 2003; Mello *et al.*, 2014). No Rio de Janeiro, a análise da prevalência foi de 4,7/1000, que corresponde à prevalência nacional entre doadores de sangue, que seria de 4,8 indivíduos infectados para cada 1000 doadores (Catalan-Soares *et al.*, 2005). Recentemente, um estudo realizado a partir de amostras de sangue coletadas de gestantes no Estado do Rio de Janeiro, foram encontrados sete casos de gestantes positivas para HTLV-1, em um total de 1204 gestantes testadas (Monteiro *et al.*, 2014). Os dados sugerem uma prevalência superior ao grupo de doadores de sangue. Esses dados apontam o Brasil como o país com o maior número absoluto de portadores do HTLV-1 no mundo.



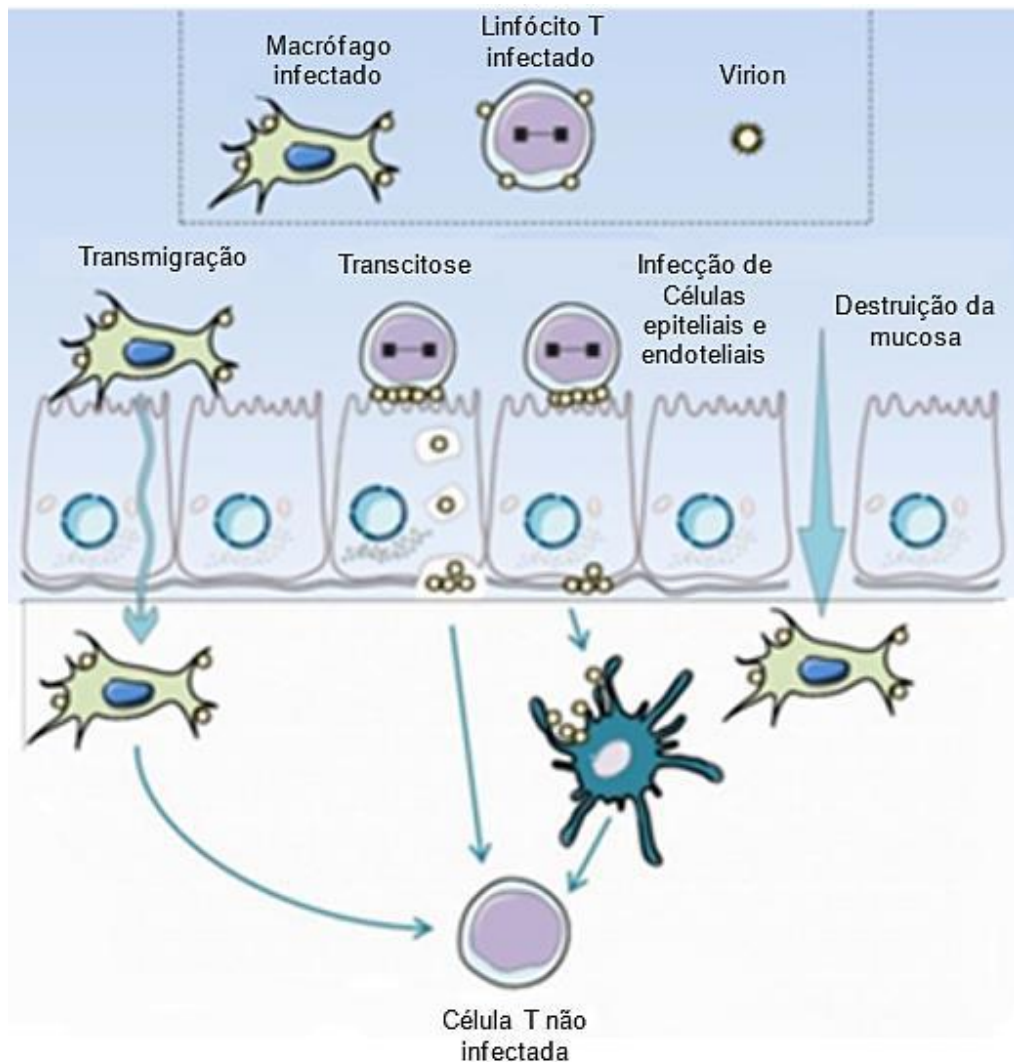
**Figura 6. Representação de prevalência da infecção pelo HTLV-1 em regiões do Brasil.** O mapa demonstra a infecção pelo HTLV-1 no Brasil utilizando amostras de bancos de sangue (Adaptado de Catalan Soares e Proietti, 2005).

#### 1.2.4 Transmissão

O HTLV-1 pode ser transmitido por relações sexuais desprotegidas, principalmente do homem para a mulher, bem como por transfusão sanguínea, uso de materiais perfuro cortantes contaminados, e através do aleitamento materno. Existem outras formas de transmissão menos

eficientes, como é o caso da transmissão por via transplacentária e durante o parto, que são consideradas raras (Carneiro-Proietti *et al.*, 2005; Pique *et al.*, 2012; Percher *et al.*, 2016).

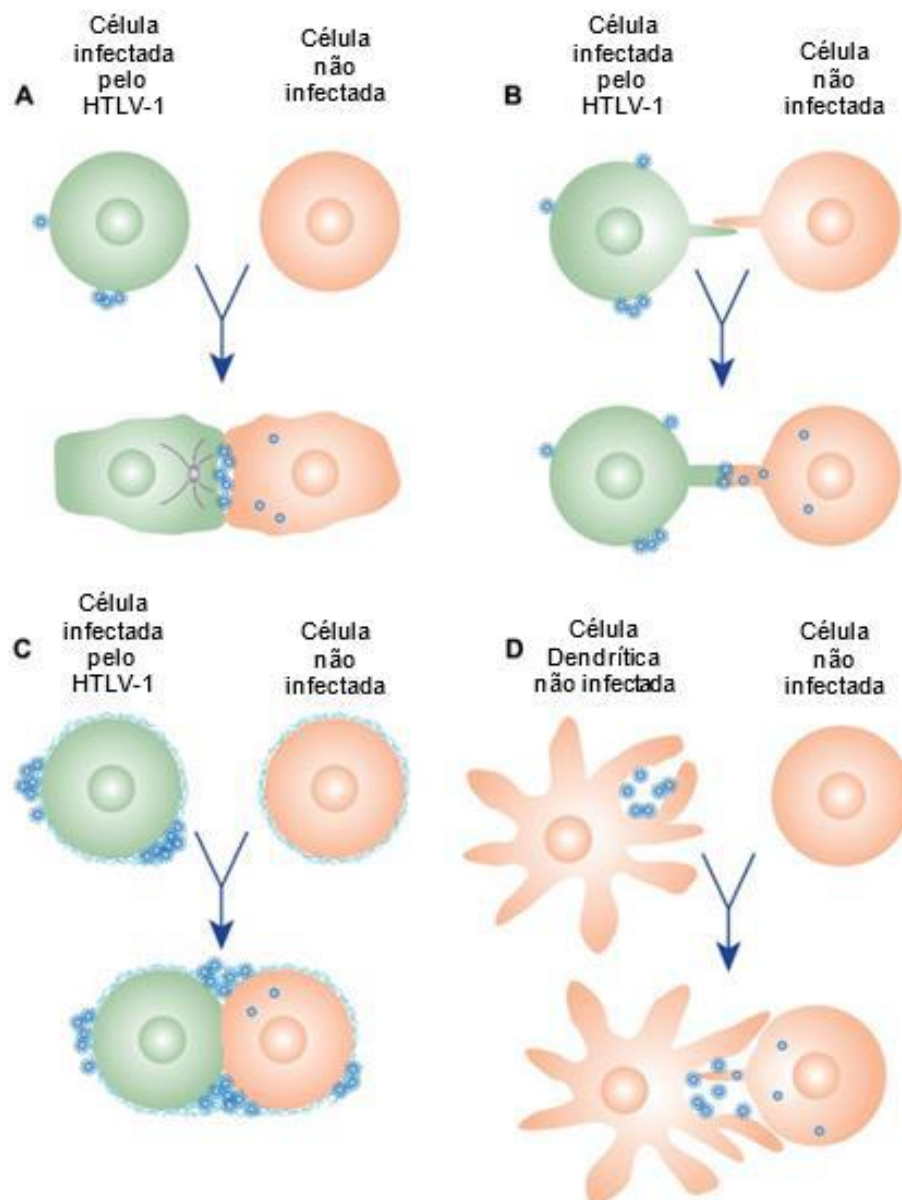
Para que ocorra transmissão do vírus durante a relação sexual e/ou aleitamento materno, o HTLV-1 precisa entrar em contato com as mucosas do indivíduo não infectado e atravessar essa barreira física. Essa passagem acontece quando macrófagos, células dendríticas e até mesmo o vírion, conseguem passar pela mucosa, através de processos como: transmigração, transcitose, infecção das células da mucosa ou por destruição dessa barreira (**Figura 7**) (Carpentier *et al.*, 2015). Os macrófagos conseguem atravessar a barreira epitelial íntegra através da transmigração, ou seja, essas células conseguem se aderir ao epitélio da mucosa e passar por essas células e chegar até a lâmina própria e infectar células-alvo. Quando essas células infectadas estão presentes no leite materno, elas podem transmitir o vírus para os linfócitos T (Takeuchi *et al.*, 2010; Carpentier *et al.*, 2015). Também já se tem descrito que os linfócitos T infectados pelo HTLV-1 podem se ligar ao epitélio e permitir que o vírion passe por transcitose. Nesse caso, os vírions passariam pelas células da mucosa dentro de vesículas, da porção apical até a basal, onde chegariam ao lúmen do tecido e infectariam outras células presentes nessa região (Takeuchi *et al.*, 2010). O linfócito T também pode infectar as células epiteliais da mucosa que passam a produzir vírus, que são liberados pela porção basal dessas células, chegando à lâmina própria e infectando células-alvo. Por último, as células infectadas ou as partículas virais podem atravessar a barreira epitelial onde, eventualmente, possa ter acontecido algum tipo de ruptura (Pique *et al.*, 2012).



**Figura 7. Modelos de quebra de barreira da mucosa na infecção pelo HTLV-1.** A figura representa diferentes maneiras pelas quais o HTLV-1 pode atravessar a barreira de mucosa. Macrófagos infectados pelo HTLV-1 podem passar por essa barreira através de transmigração chegando até a lâmina própria e infectando células-alvo. Linfócitos T carregando partículas virais podem se ligar ao epitélio e permitir que o vírion passe por transcitose. Linfócitos T infectados podem infectar as células epiteliais, que passam a produzir vírus que são liberados pela porção basolateral. Células infectadas ou o próprio vírion podem passar pela mucosa através da ruptura dessa estrutura. (Adaptado de Carpentier *et al.*, 2015).

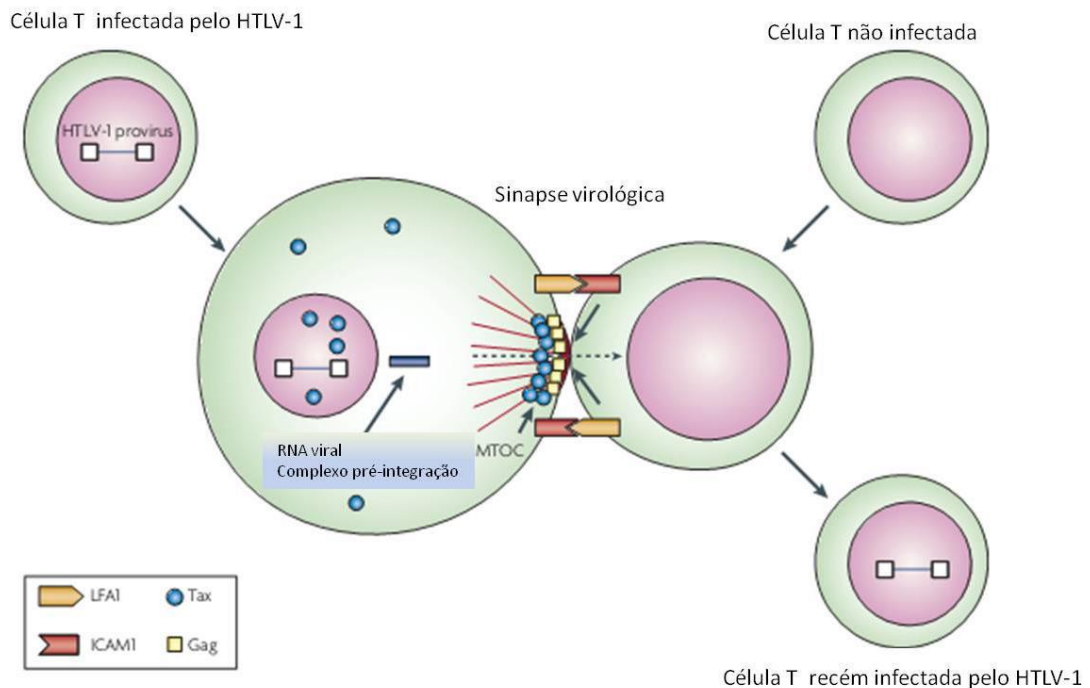
Existem diversos mecanismos utilizados pelo HTLV-1 para a infecção de uma célula alvo. Contudo, o contato célula-célula é 10.000 vezes mais eficiente do que outros processos de infecção (Fan *et al.*, 1992). Os mecanismos de interação célula-célula incluem: a sinapse virológica, formação de condúites celulares, formação de aglomerados virais extracelulares e transinfecção mediada por células dendríticas (**Figura 8**).





**Figura 8. Transmissão do HTLV-1 por contato célula-célula.** As células em verdes representam células infectadas pelo HTLV-1, células em rosa representam células não infectadas. (A) Sinapse virológica; (B) Formação de conduítes celulares; (C) Aglomerados virais extracelulares; e (D) Transinfecção mediada por células dendríticas (DCs) (Adaptada de Pique *et al.*, 2012).

Para que a sinapse virológica ocorra, são necessários dois sinais: a expressão da proteína Tax na célula infectada e a expressão de moléculas de adesão ICAM-1 (CD54) na célula alvo e de LFA-1 (CD18) na célula infectada. O engajamento de LFA-1 possibilita a rápida polarização do citoesqueleto das células infectadas para a região das junções entre as células. A proteína Tax auxilia na recomposição e alongamento dos microtúbulos devido ativação de *Small GTPases*. O material genético do HTLV-1 e as proteínas virais estruturais Env e Gag são endereçados para a região da sinapse virológica. Após esse processo, ocorre a transmissão do vírus para a célula-alvo (Igakura *et al.*, 2003; Nejmeddine *et al.*, 2005) (**Figura 9**).



**Figura 9. Esquema da sinapse virológica.** A expressão de Tax e a ligação das moléculas ICAM e LFA-1 são importantes para o redirecionamento do citoesqueleto. Após engajamento de ICAM-1 e LFA-1, o RNA genômico viral e as proteínas virais estruturais se acumulam na região da sinapse e, conseqüentemente, o vírus pode ser montado e então ser transmitido a uma célula-alvo (Adaptado de Matsuoka *et al.*, 2007).

O aumento do número de células infectadas, e conseqüentemente da carga proviral, se dá quando células infectadas pelo HTLV-1 sofrem expansão clonal. Assim, o provírus integrado ao material genético dessa célula também é replicado, incluindo assim mais um mecanismo de replicação desse vírus. Linfócitos T infectados pelo HTLV-1 apresentam um aumento na expressão da cadeia  $\alpha$  do receptor para IL-2 (CD25), assim como produz maiores quantidades de IL-2. Essa mudança no perfil de expressão é induzida pela proteína viral Tax, que contribui para o aumento do número de células infectadas (Nishiura *et al.*, 1996; Starling *et al.*, 2013).

### 1.2.5 Doenças associadas à infecção pelo HTLV-1

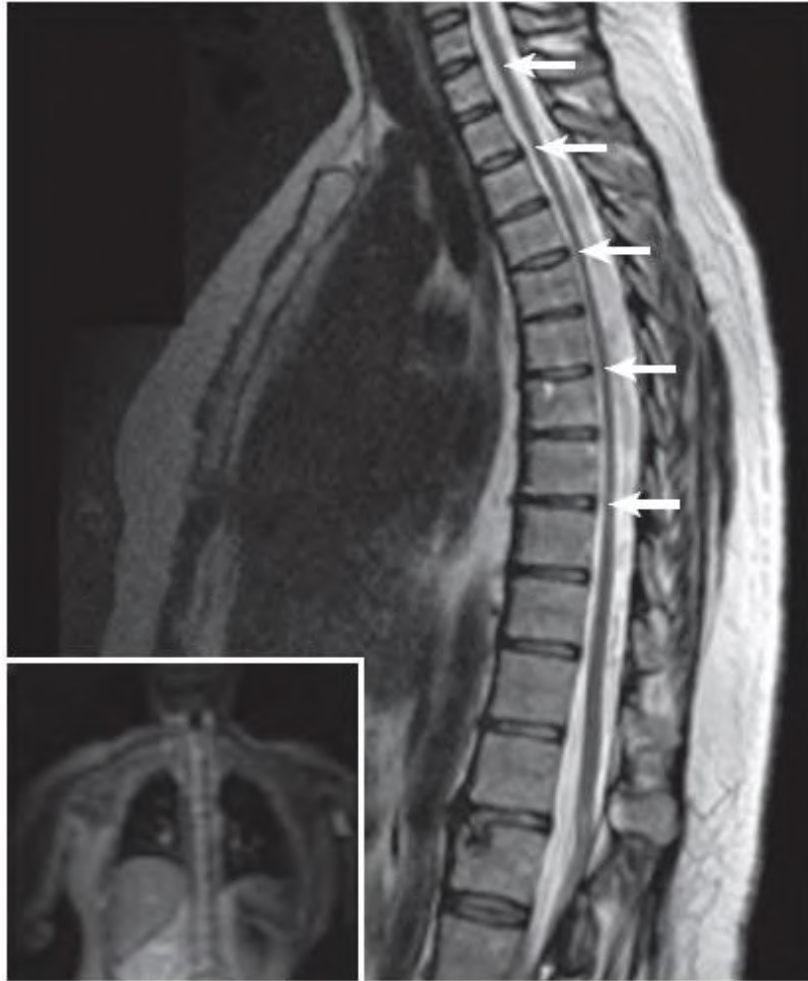
O HTLV-1 causa uma infecção crônica, persistente e tem como principal alvo linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Entretanto, esse vírus também é capaz de infectar linfócitos T CD8<sup>+</sup>, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células da microglia (Franchini *et al.*, 1985; Richardson *et al.*, 1990; Hoffman *et al.*, 1992; Koyanagi *et al.*, 1993; Cho *et al.*, 1995). Aproximadamente 95% dos indivíduos infectados com HTLV-1 mantêm-se assintomática por vários anos e somente 1-5% apresentam alguma complicação associada à infecção.

As manifestações clínicas causadas pelo HTLV-1 podem ser divididas em dois grandes grupos: neoplásicas, onde o paciente desenvolve a ATLL (Takatsuki *et al.*, 1977); e as inflamatórias onde o indivíduo desenvolve, principalmente, a mielopatia associada ao HTLV-1 (MAH/PET) (Gessain *et al.*, 1985). Existem também outras manifestações clínicas como

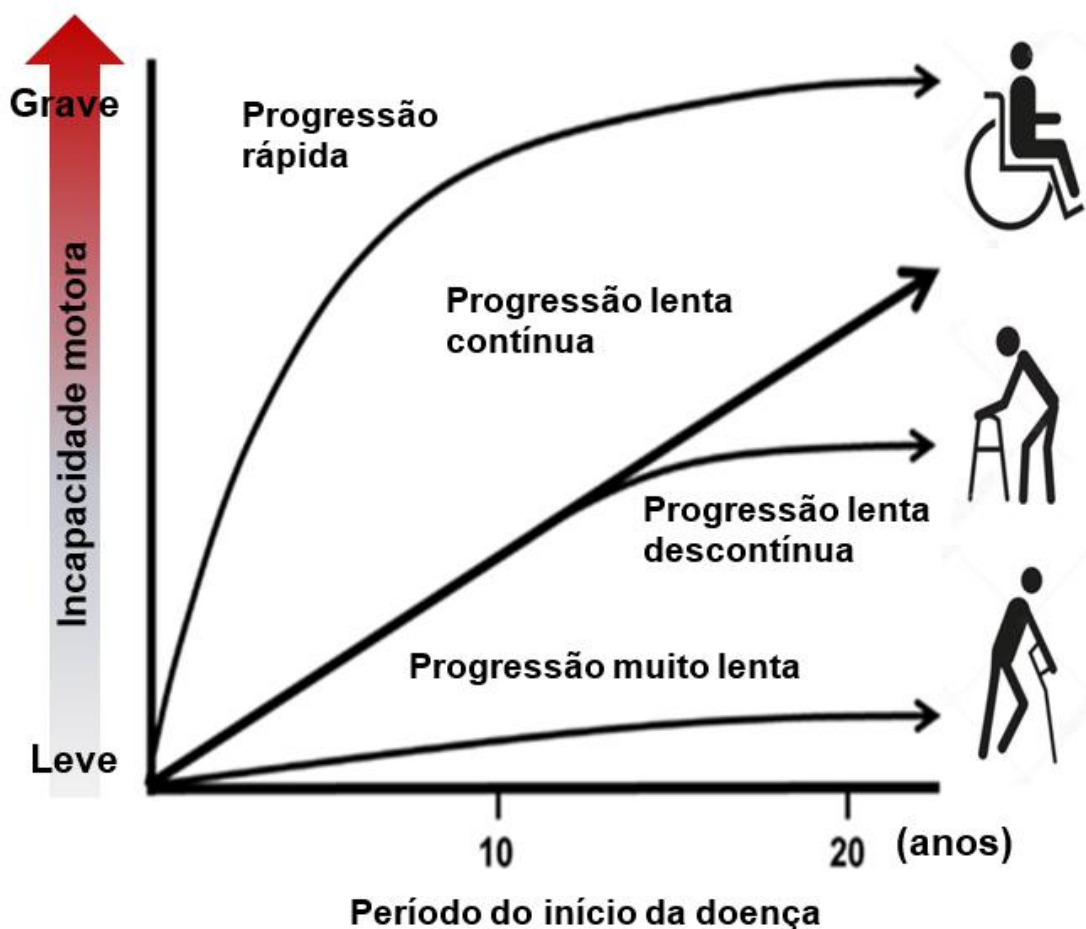
uveíte, polimiosite e artrite (Morgan *et al.*, 1989; Nishioka *et al.*, 1989; Mochizuki *et al.*, 1992), além de imunodeficiência manifestada sob a forma de dermatite infecciosa, síndrome de Sjögren, tireoidite e alveolite linfocítica (Uchiyama, 1997; Watanabe, 1997). Algumas infecções oportunistas têm sido associadas à infecção pelo HTLV-1 em indivíduos com ou sem sintomas neurológicos. As infecções mais comumente associadas a esses quadros são ocasionadas pelo helminto *Strongyloides stercoralis*, pelo ectoparasita *Sarcoptes scabiei*, pelo vírus causador do molusco contagioso (doença dermatológica), pelo fungo *Histoplasma capsulatum* e por *Staphylococcus* spp. (Gonçalves *et al.*, 2010), além da alta incidência de casos de tuberculose (Grassi *et al.*, 2016).

#### **1.2.5.1 Mielopatia associada ao HTLV-1**

A MAH/PET é uma doença crônica, inflamatória, incapacitante, de progressão na qual se observa danos ao sistema nervoso central (SNC), com perda da bainha de mielina e de axônios. Clinicamente, a MAH/PET se expressa como uma paraparesia espástica acompanhada de alterações esfínterianas, dor lombar, disfunção erétil, neuropatia periférica e alterações cognitivas (Richardson *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2004). Essa doença apresenta um padrão bifásico, onde inicialmente o paciente apresenta uma fase inflamatória caracterizada pela infiltração de células mononucleares infectadas e/ou ativadas no SNC, e que são encontradas com maior frequência na medula espinhal torácica superior. O infiltrado é denso em torno dos vasos sanguíneos, mas pode estar difuso no parênquima (Izumo *et al.*, 1992). O processo inflamatório culmina, após meses ou anos, em alterações macroscópicas do SNC, em que o paciente apresenta evidente perda do volume da medula espinhal (**Figura 10**) (Alcindor *et al.*, 1992; Shakudo *et al.*, 1999), bem como sintomas de neurodegeneração e atrofia (Iwasaki *et al.*, 1992; Nagai *et al.*, 1998). Indivíduos com MAH/PET apresentam mais regiões atrofiadas na medula espinhal quando comparados com indivíduos assintomáticos e saudáveis. A perda de volume da medula está diretamente associada com a carga proviral do HTLV-1 no líquido cefalorraquidiano. Os danos na medula espinhal começam na região torácica e se estendem até a região cervical (Azodi *et al.*, 2017). Indivíduos com MAH/PET apresentam diminuição significativa da motilidade dos membros inferiores, podendo necessitar do uso de muletas, andadores e, em casos mais graves, de cadeira de rodas para sua locomoção (**Figura 11**) (Facchinetti *et al.*, 2013). Apesar da MAH/PET ser classificada como uma doença crônica de progressão lenta, alguns pacientes apresentam progressão rápida, tendo de fazer uso da cadeira de rodas em até no máximo 5 anos (Lima *et al.*, 2007).



**Figura 10. Ressonância magnética da medula espinhal de paciente com MAH/PET.** A medula espinhal anormalmente fina (escura) é indicada com setas. Inserção mostra visão anteroposterior da coluna cervical e torácica. Imagem do *Imperial College Healthcare NHS Trust*, Reino Unido. (Figura adaptada de Bangham *et al.*, 2015).



**Figura 11. Representação esquemática do curso clínico da MAH/PET.** A progressão da MAH/PET pode variar entre os pacientes. Entretanto, normalmente ocorre de maneira lenta, sendo o período de incubação entre 10 e 20 anos. O paciente pode ter progressão muito lenta, onde o indivíduo começa a apresentar distúrbios da marcha com incapacidade motora leve, como dificuldade de locomoção necessitando do auxílio de bengalas. Na progressão lenta descontínua, o paciente evolui para o uso de andadores. Além disso, existem os casos de progressão lenta contínua, onde o paciente evolui de forma constante até tornar-se cadeirante. O paciente também pode apresentar progressão rápida, chegando ao estado de cadeirante em pouco tempo (Adaptado Yamano e Sato, 2012).

Indivíduos infectados por HTLV-1 também podem apresentar comprometimento cognitivo, que pode estar associado à infecção viral e ao processo inflamatório desencadeado durante a progressão da doença. Altos níveis de IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$  têm sido associados com disfunção cognitiva em idosos e portadores de doenças reumatológicas (Kozora *et al.*, 2001; Dik *et al.*, 2005; Mcafoose *et al.*, 2009). Além dos sintomas físicos e suas consequências, os pacientes com MAH/PET, por terem conhecimento de que a doença progride com o tempo, não tem cura e diminui a expectativa de vida, acabam manifestando quadros de ansiedade e depressão (Franzoi *et al.*, 2005; Netto *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012).

### 1.3 Resposta imunológica durante a infecção e desencadeamento da MAH/PET

Após o processo de infecção, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> entram em um estado de ativação e proliferação espontânea. (Prince *et al.*, 1994). Esse fenômeno envolve o aumento na expressão

de vários genes relacionados com a proliferação e ativação celular. Dentre esses genes, destacam-se os que codificam para moléculas como: IL-2, CD25, IL-15, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), entre outros (Nishiura *et al.*, 1996; Higuchi *et al.*, 1997; Bangham, 2003; Barmak *et al.*, 2003). Além disso, a infecção pelo HTLV-1 promove a inativação da proteína p53, levando ao bloqueio do reparo de DNA, e promove o aumento da síntese de proteínas anti-apoptóticas, bloqueando a apoptose (Barmak *et al.*, 2003; Franchini *et al.*, 2003).

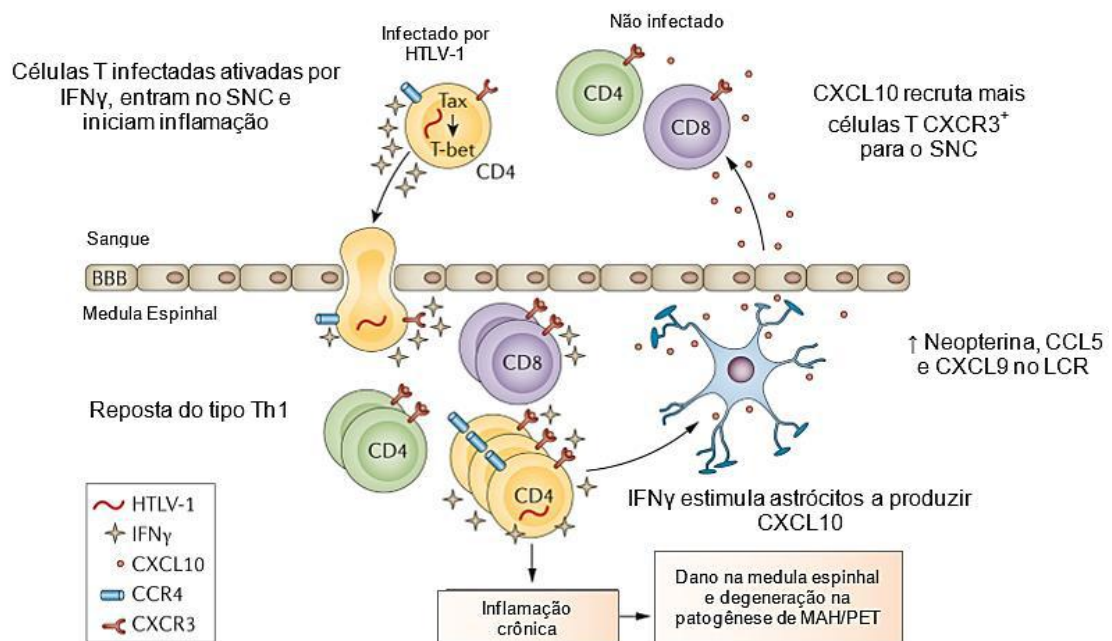
Em indivíduos infectados, as células B promovem uma rápida produção de anticorpos contra proteínas virais (Grant *et al.*, 2002). Entretanto, a resposta humoral não é suficiente para proteger o indivíduo, embora exerça um importante papel no controle do número de células infectadas (Bangham, 2003).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> controlam a infecção através da eliminação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> infectados, permanecendo, assim, em um estado crônico de ativação (Bangham, 2003). A resposta citotóxica parece ser fundamental para definir se o paciente desenvolverá MAH/PET ou se permanecerá em um estado assintomático. Ao passo que uma resposta citotóxica eficiente é capaz de controlar o número de células infectadas (carga proviral), mantendo assim o indivíduo assintomático, uma resposta citotóxica ineficaz permite o aumento do número de células infectadas e, conseqüentemente, contribui para o estabelecimento de inflamação crônica que promove a lesão do sistema nervoso central (Bangham, 2003). O vírus estabelece reservatórios em regiões como medula óssea e, por isso, mesmo indivíduos com sistema imunológico funcional não são capazes de eliminar completamente o vírus do organismo (Ercoli *et al.*, 1996; Jacobson *et al.*, 1997).

As células infectadas migram para o SNC, especialmente para a região torácica da medula espinhal. Apesar de não se saber o mecanismo que induz essa migração celular, sabe-se que os linfócitos infectados pelo HTLV-1 têm maior capacidade migratória. Acredita-se que essas células causem lesão neurológica nessa região medular sem levar a morte neuronal diretamente pela infecção. Sugere-se que a lesão acontece devido a reações inflamatórias causadas pelo reconhecimento de células infectadas por linfócitos T CD8 (Fuzii *et al.*, 2014). Pacientes com MAH/PET apresentam níveis elevados de quimiocinas (CXCL9 e CXCL10) que promovem o recrutamento de células para o SNC (Yamano *et al.*, 2013). Além disso, observa-se o aumento de expressão das moléculas de adesão VCAM-1 (CD106), VLA-4 (heterodímero CD49d e CD29) e CCL2 (MCP1) no endotélio vascular do SNC, e o aumento da produção de metaloproteases (MMP-9 e MMP-2) (Giraudon *et al.*, 1998). A secreção de citocinas e o aumento da expressão de moléculas de adesão e metaloproteínas pode estar associada com os níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 no sangue periférico

e no líquido cefalorraquidiano, por serem capazes de estimular a secreção destes mediadores (Lepoutre *et al.*, 2009; Matsuura *et al.*, 2010; Fuzii *et al.*, 2014). Além disso, dados da literatura indicam que os linfócitos que atravessam a barreira hematoencefálica (BHE) continuam secretando essas citocinas causando, assim, danos neurológicos (Brosnan *et al.*, 1988; Kuroda *et al.*, 1993, Nakamura *et al.*, 1993).

O modelo *bystander* é o mais aceito para explicar a patogênese da MAH/PET (**Figura 12**). Esse modelo propõe que linfócitos T CD4<sup>+</sup> infectados pelo HTLV-1 e linfócitos T anti-HTLV-1 passam pela BHE e chegam até o SNC, onde promovem uma resposta inflamatória que gera estresse de células da glia e destruição da mielina e dos axônios (Selmaj *et al.*, 1988; Taylor, 1998).



**Figura 12. Modelo representativo do desenvolvimento da MAH/PET.** As células infectadas pelo HTLV-1 são ativadas pela proteína Tax. Após esse processo de ativação, as células hospedeiras ativadas atravessam a BHE, passando para o SNC. No SNC, as células T secretam IFN- $\gamma$  que estimula astrócitos a produzirem e liberarem CXCL10, recrutando mais células T CXCR3<sup>+</sup>, estabelecendo a inflamação crônica (Adaptado Bangham *et al.*, 2015).

Meylan e colaboradores (2006) descreveram que células da imunidade inata também são ativadas através de receptores de reconhecimento associados a danos e, por esse motivo, acabam desencadeando uma resposta que contribui para a transmissão do vírus e desenvolvimento da doença. Essas células participam do controle inicial às infecções, respondendo aos patógenos extracelulares, estimulando o reparo tecidual, além de participarem da ativação e formação da resposta efetora de células da imunidade adaptativa (Journo e Mahieux, 2011). As células dendríticas, por exemplo, secretam mais IFN do tipo 1 em

portadores de HTLV-1 e, conseqüentemente, acabam diminuindo a carga proviral (Hishizawa *et al.*, 2004). Monócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam uma menor capacidade de diferenciação em células dendríticas quando comparados com monócitos de indivíduos não infectados (Nascimento *et al.*, 2011). Monócitos de pacientes com MAH/PET apresentam alteração na expressão de proteínas do citoesqueleto quando comparados com indivíduos não infectados. E apresentaram maior capacidade de transmigração e adesão ao endotélio quando comparados com indivíduos assintomáticos ou não infectados (Echevarria *et al.*, 2018).

#### **1.4 Macrófagos e a MAH/PET**

Macrófagos derivados de monócitos são fagócitos importantes na imunidade inata, sendo a heterogeneidade funcional uma característica essencial que distingue suas propriedades pró e anti-inflamatórias. Essa plasticidade nas propriedades funcionais dos macrófagos é determinada pelo microambiente em que as células se encontram (Kadl *et al.*, 2010). Os macrófagos são encontrados em praticamente todos os tecidos de mamíferos, onde monitoram o ambiente local e contribuem para a manutenção da homeostase (Hume *et al.*, 1983; Davies *et al.*, 2013; Wynn *et al.*, 2013). Essas células desempenham muitas funções tecido-específicas, o que se reflete em sua diversidade fenotípica. Desse modo, macrófagos alveolares, células de Kupffer, microglia e osteoclastos têm funções e fenótipos especializados, indicando que os sinais derivados de tecidos locais podem controlar o desenvolvimento de fenótipos específicos para cada tecido (Gordon e Taylor, 2005; Murray e Wynn, 2011).

Os macrófagos podem ser classicamente ou alternativamente ativados em resposta a estímulos. Macrófagos classicamente ativados, também chamados de M1, são induzidos por IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e GM-CSF (Ohri *et al.*, 2009; Kadl *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2010). Os macrófagos M1 se caracterizam pela capacidade de apresentar antígenos, alta produção de IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Ginderachter *et al.*, 2006; Kadl *et al.*, 2010). Em contraste, os macrófagos alternativamente ativados, ou M2, são induzidos na presença de IL-4 e IL-13 (Mantovani *et al.*, 2004; Ohri *et al.*, 2009; Kadl *et al.*, 2010) e são caracterizados como macrófagos que atuam no remodelamento e reparo tissular (Mantovani *et al.*, 2009). Além disso, os macrófagos M2 secretam altos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  e baixos níveis de citocinas inflamatórias (Ginderachter *et al.*, 2006; Kadl *et al.*, 2010).

Os macrófagos podem estar envolvidos no processo de neurodegeneração característica da esclerose múltipla, uma vez que, a depleção destas células em camundongos com encefalomielite experimental autoimune (EAE) leva a suspensão completa dos sinais clínicos



característicos da doença melhorando os sintomas neurológicos (Huitinga *et al.*, 1990). A interação entre macrófagos e astrócitos desempenha um papel importante durante o início e a progressão do processo neurodegenerativo associados às manifestações neurológicas relacionadas à infecção pelo HIV-1, doença de Alzheimer e esclerose múltipla (Minagar *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que existem também macrófagos perivasculares que fazem parte de uma população distinta de macrófagos cerebrais residentes. Essas células apresentam uma associação direta com a microvasculatura no SNC. Algumas evidências sugerem que os macrófagos perivasculares são a principal população de células infectadas pelo HIV-1 (Williams *et al.*, 2001). Já em lesões ativas de pacientes com esclerose múltipla, um número grande dessas células é encontrado. Essas células também expressam a proteína básica de mielina e o complexo principal de histocompatibilidade, sugerindo que eles podem processar e apresentar esta proteína como antígeno aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Zhang *et al.*, 2011). Além disso, esses macrófagos podem exacerbar a EAE, possibilitando o recrutamento de monócitos através da expressão de quimiocinas como MCP-1 (CCL2) e MIP-1 $\alpha$  (CCL4) (Hofmann *et al.*, 2002).

Pouco se sabe sobre o papel dos macrófagos na infecção pelo HTLV-1, mas sabe-se que podem ser infectadas pelo vírus *in vitro* e *in vivo* (Koyanagi, 1993). Macrófagos isolados do colostro e infectados *in vitro* com HTLV-1 são capazes de fagocitar e estimular eficientemente linfócitos T, podendo também infectar novas células, representando uma possível via de infecção de mãe para filho (Takeuchi *et al.*, 2010). Além disso, fagócitos mononucleares já foram detectados ao redor dos vasos sanguíneos, no parênquima e meninges na medula espinhal de pacientes com MAH/PET, sugerindo um recrutamento destas células da periferia para a medula espinhal (Enose-Akahata *et al.*, 2012). Já foi descrito que macrófagos dos indivíduos infectados com HTLV-1 produzem mais CXCL9 e CCL5 e menos IL-10 do que os macrófagos de indivíduos saudáveis, mesmo após o estímulo com LPS. Esses achados indicam que essas células apresentam um comprometimento na produção de IL-10 e representam uma das fontes de CXCL9 no SNC, quimiocina encontrada em níveis elevados nos pacientes com MAH/PET e fortemente correlacionada com a taxa de progressão da doença (Sato *et al.*, 2013; Amorim *et al.*, 2014).

### **1.5 Modelos alternativos para estudar o SNC**

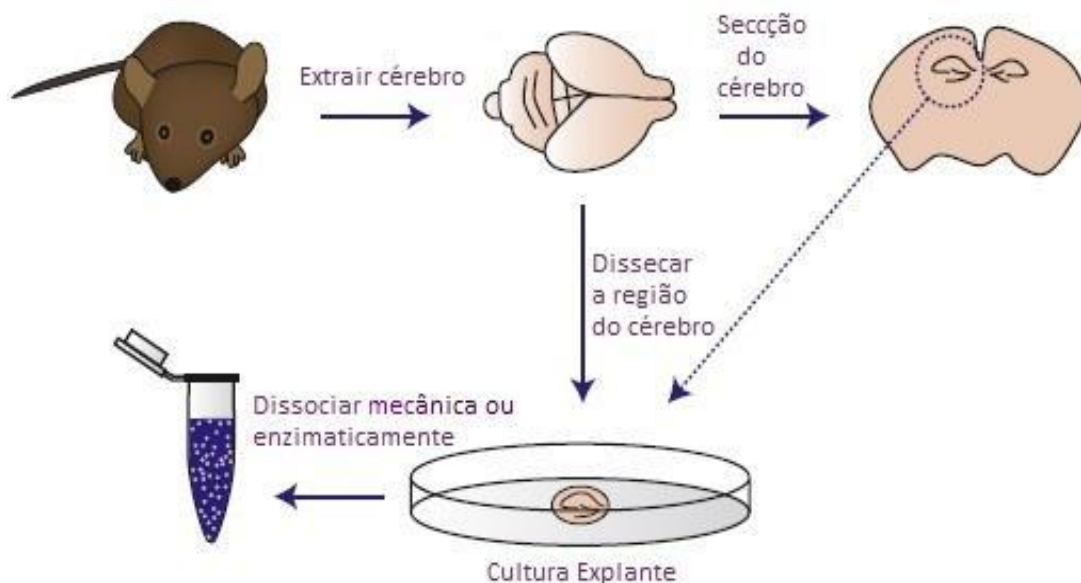
O SNC é formado pelo cérebro e medula espinhal, e estes são constituídos por células especializadas denominadas neurônios, células de suporte do SNC (células gliais) e vasos

sanguíneos. O tecido nervoso central é composto por oligodendrócitos, astrócitos, micróglia e células endimárias. Além disso, o cérebro e a medula espinhal são revestidos por 3 camadas de tecido de suporte denominado coletivamente de meninges (Young e Heath, 2000).

No início do século XX, iniciou-se o cultivo *in vitro* de tecidos explantados, que foram utilizados para caracterização morfológica do desenvolvimento tecidual fetal e embriológico, e para a comparação destes com o crescimento tumoral. A cultura de explante primário é uma abordagem utilizada para isolar células de vários tipos de tecidos. Um fragmento simples e pequeno de tecido que adere à superfície de crescimento, geralmente, dará origem a um crescimento de células (Zhang *et al.*, 2005; Vunjak-Novakovic e Freshney., 2006; Klingbeil *et al.*, 2009).

A cultura de explantes cerebrais foi amplamente adotada para estudos da fisiologia e desenvolvimento do SNC (Cho, Wood e Bowby., 2007). As culturas de explantes consistem em fragmentos intactos de tecido (**Figura 13**). Embora não preservem necessariamente a organização e a orientação precisas do sistema nervoso endógeno, os explantes contêm a mesma mistura de tipos celulares. Essas culturas podem ser submersas nos meios de cultura e são, frequentemente, usadas em ensaios de cocultivo e para estudos sobre crescimento de neuritos e migração neuronal (Carter e Shieh, 2015). Esse modelo já foi aplicado para estudar diversas doenças relacionados com danos no SNC, como por exemplo, a esclerose múltipla (Blauth *et al.*, 2015), bem como já foi utilizado para estudo de infecções virais. A cultura de explantes neurais já foi utilizada para entender melhor como citocinas e metabólitos produzidos durante as interações macrófago e astrogliia infectados pelo HIV-1 tem implicações na neurocitotoxicidade associada a infecção viral no SNC (Genis *et al.*, 1992). Também já foi utilizado para estudos com o vírus Zika e explantes de placenta; e para transferência gênica mediada por retrovírus para explantes de retina (Hatakeyama e Kageyama, 2002; Hermanns *et al.*, 2018).

O explante pode também ser dissociado mecânica ou enzimaticamente dentro de uma suspensão líquida para separar as células uma das outras. Os neurônios são então retirados da suspensão e semeados em um substrato no qual as células conseguem se aderir e crescer. Neurônios dissociados de diferentes regiões do cérebro mantêm suas identidades iniciais. As propriedades morfológicas, moleculares e fisiológicas das populações celulares presentes na cultura correspondem intimamente às características da população celular presente na região de origem de um organismo vivo (Carter e Shieh, 2015).



**Figura 13. Cultivo primário de células de cérebro murino.** Após a remoção do cérebro do animal, uma fatia do cérebro ou uma região do cérebro pode ser cortado em partes finas para produzir uma cultura de explante. Essa cultura também pode ser dissociada mecânica ou enzimaticamente em células individuais para produzir uma cultura dissociada (Figura adaptada Carter e Shieh, 2015).

## 2. JUSTIFICATIVA

A MAH/PET é uma doença não letal e socialmente devastadora, pois pode deixar o indivíduo restrito a uma cadeira de rodas. Apesar do HTLV-1 ter sido descoberto há décadas, numerosas questões permanecem não respondidas, como por exemplo: “Por que e como as células infectadas invadem o SNC?”. A lesão neurológica pode ocorrer por diversos motivos, incluindo a morte das células infectadas pelo vírus, pela reação inflamatória desencadeada no SNC, com um importante infiltrado de células do sistema imune. Isso inclui as células T CD4<sup>+</sup> e macrófagos e depende do processo de quebra da barreira hematoencefálica. Muitas perguntas sobre como ocorre o desencadeamento da MAH/PET ainda não foram respondidas devido à escassez dos tipos de modelo para se estudar essa doença. A maior parte dos modelos utilizados para o HTLV-1 não incluem o estudo da MAH/PET. Como os pacientes com MAH/PET apresentam infiltrado de monócitos e macrófagos ativados no SNC e existem poucos modelos para se estudar essa doença, nos propomos a caracterizar o perfil fenotípico e funcional de macrófagos murinos ativados e/ou infectados pelo HTLV-1, como também investigar se esses macrófagos podem causar algum efeito deletério as células neurais da medula espinhal através de modelos *in vitro* utilizando culturas organotípicas obtidas de camundongos. Acreditamos que essas alterações podem gerar novas informações a respeito do papel dos macrófagos no desencadeamento da MAH/PET.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Caracterização fenotípica e funcional dos macrófagos murinos cocultivados com células permanentemente infectadas pelo HTLV-1 (MT-2), e avaliação do efeito destas células sobre o sistema nervoso central.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a morfologia e o perfil fenotípico dos macrófagos, provenientes de lavado peritoneal de camundongos, cocultivados com MT-2 (MØ/MT-2);
- Avaliar a viabilidade dos macrófagos após o cocultivo com as células MT-2;
- Realizar um ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas culturas de macrófagos a fim de comparar a capacidade de produção de ERO após o cultivo com a MT-2;
- Comparar a capacidade fagocítica dos macrófagos mantidos em cultura com a MT-2 (MØ/MT-2) com os macrófagos controles;
- Dosar citocinas no sobrenadante das culturas dos MØ/MT-2;
- Investigar se há DNA dupla-fita liberado nas culturas de macrófagos com MT-2 (MØ/MT-2);
- Avaliar o efeito do cocultivo entre MØ/MT-2 e explantes neurais embrionários;
- Avaliar a viabilidade dos explantes neurais quando cocultivados com MØ/MT-2.

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1 Cultura de células**

As células MT-2, que são linhagem de linfócitos T CD4 humano permanentemente infectada pelo HTLV-1, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Otávio Espíndola (Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fiocruz). As células MT-2 foram estabelecidas por Miyoshi *et al.* a partir de leucócitos humano cocultivados com células de leucemia de células T do adulto (Miyoshi *et al.*, 1981; Yamamoto *et al.*, 1982). Essas células possuem a expressão gênica do interferon IFN- $\gamma$  aumentada (Higashi *et al.*, 2005), e os níveis proteicos de citocinas, como fator de necrose tumoral TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , podem variar de acordo com os subtipos dessa linhagem. As células MT-2J produzem IFN- $\gamma$ , mas em níveis baixos quando comparados com a MT-2B que produzem níveis altos de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  (Nomura *et al.*, 2019).

As células foram cultivadas em garrafas plásticas com meio RPMI 1640 (LGC Biotechnology, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco), com

penicilina (100 UI/mL, LGC Biotechnology, Brasil) e estreptomicina (100 UI/mL, LGC Biotechnology, Brasil). As células permaneceram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Foram realizadas duas passagens semanais dessas células. As células MT-2 foram irradiadas (20 Gy) para controlar a replicação dessas células, uma vez que, a irradiação não altera outras funcionalidades. Em seguida as células foram lavadas e ressuspensas em meio de cultura.

#### **4.2 Animais**

Para realização do lavado peritoneal e obtenção de linfócitos dos linfonodos foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagem e Swiss (machos ou fêmeas; 8 a 12 semanas de idade) mantidos em gaiolas plásticas apropriadas. E para obtenção da cultura de explantes neurais foram utilizados embriões de camundongos Swiss. Todos os animais foram mantidos em Biotério em temperatura constante (25 °C) e com ciclos de 12 horas de luz/escuridão. Os procedimentos realizados em animais foram aprovados pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais em Experimentação) aprovados sob protocolo n° 110/19.

#### **4.3 Lavado Peritoneal**

Os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células do peritônio foram coletadas em 10 mL de PBS gelado com o auxílio de uma seringa e agulha. As células foram centrifugadas a 300 g por 7 minutos, ressuspensas em RPMI 1640 suplementado com 10% SFB. Foram semeadas 5x10<sup>6</sup> células por poço em placa de 6 poços com volume final de 2 mL. Em seguida, as células foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5 % CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após esse período de incubação, os macrófagos foram enriquecidos retirando as células em suspensão, deixando apenas as células aderidas à placa.

#### **4.4 Obtenção de linfócitos murinos**

Os linfócitos totais foram obtidos através da extração e dissociação das células dos linfonodos. Em seguida as células foram centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% SFB. As células foram semeadas em placa de 6 poços e foram incubadas com IL-2 (20 ng/mL) por 24 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. As células em suspensão da cultura foram coletadas, irradiadas (20 Gy) e lavadas para troca do meio após a irradiação.

#### **4.5 Explantes neurais**

As fêmeas grávidas, com 12 dias de gestação, foram eutanasiadas em câmara de CO<sub>2</sub> e os embriões foram removidos do útero e mantidos em tampão PBS estéril. Para o experimento

foram utilizadas as porções cervical e torácica da medula espinhal dos embriões, que foram dissecadas e mantidas no gelo em uma placa de Petri com PBS. Em seguida, as células foram segmentadas (200  $\mu\text{m}$ ), utilizando chopper (McIlwain Tissue Chopper). Posteriormente a medula segmentada foi transferida para uma placa de Petri com meio DMEM estéril e gelado. Em seguida, as fatias de interesse foram selecionadas e transferidas para uma placa de 24 poços com lamínulas circulares estéreis. Depois da transferência dos cortes, parte do meio foi retirado de modo a deixar o volume final em 200  $\mu\text{L}$ . A placa foi incubada por 2-3 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$ .

As lamínulas circulares foram previamente sensibilizadas com 20  $\mu\text{L}$  de Poli-lisina (0,1%) por 1 hora a 37 °C. Esse procedimento foi feito para ativar a aderência da lamínula de modo que o explante de medula consiga aderir à superfície. Depois as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS e foram colocadas em placas de 24 poços com 300  $\mu\text{L}$  de meio DMEM estéril e suplementados com 10% SFB, penicilina e estreptomicina.

#### **4.6 Cocultura**

Os linfócitos alogeneicos murinos, obtidos dos linfonodos, e as células MT-2 foram previamente irradiadas (20 Gy) e semeadas na proporção 1:2 ou 1:3 nos poços com os macrófagos. Nos controles com as células aderidas foi trocado apenas o meio. As células foram incubadas por 72 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$ . As células em suspensão foram retiradas após centrifugação a 300 g por 5 minutos e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20 °C para posterior uso.

Os macrófagos cocultivados com os linfócitos murinos ou com as células MT-2 foram soltas utilizando PBS e EDTA 1 mM gelado, e em seguida foram centrifugadas e ressuspendidas em meio DMEM. Os macrófagos ressuspendidos em meio DMEM foram adicionados ( $5 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  células/poço) na borda dos poços contendo os explantes neurais de medula de camundongos aderidos em lamínulas circulares (embriões) por 72 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de  $\text{CO}_2$ .

#### **4.7 Imunofenotipagem**

Após o cocultivo das células derivadas do lavado peritoneal de camundongos com células MT-2 foi feita a imunofenotipagem das células aderidas por citometria de fluxo, utilizando anticorpos específicos. Para tal, após as 72 horas do cocultivo, as células foram soltas utilizando PBS e EDTA 1 mM e foram centrifugadas a 300 g por 5 minutos e marcadas por 30 minutos no gelo em volume final de 30  $\mu\text{L}$ . Para tal, as células receberam Fc-block e foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-F4/80 APC (1:100), anti-CD80 FITC (1:50), anti-

MHCII PECy7 (1:200) e CD11b APC (1:200). Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 300 g por 5 minutos a 4 °C. As leituras foram realizadas no citômetro de fluxo *FACSCalibur* com aquisição de 10.000 eventos para a análise da porcentagem das células. As análises finais foram feitas no Software *FlowJo* 10.0.

#### **4.8 Microscopia de Fluorescência**

Os poços com o explante foram lavados com PBS-T (PBS + 0,1% Triton-X 100; Sigma-Aldrich) por 30 minutos. Em seguida, as células receberam 300 µL da solução de bloqueio (PBS-T + 10% soro de cabra). Após 2 horas a temperatura ambiente, as células foram incubadas overnight a 4 °C ao abrigo da luz com anticorpo anti-F4/80 conjugado com APC (eBioscience, 1:300 v/v) e com anti-Tuj-1, marcador de β-tubulina III específica de neurônio (Sigma-Aldrich, 1:500 v/v). As células foram lavadas três vezes com 300 µL de PBS-T sob agitação por 5 minutos. Depois, foi adicionado o anticorpo secundário, para o anti-neurônio, anti-IgG de coelho feito em cabra conjugado com Alexa Fluor 488 (Life Technologies, 1:500 v/v) nos poços. Após 2 horas a temperatura ambiente, as células foram lavadas três vezes com PBS-T sob agitação e em seguida foram marcadas com *Hoescht* (10 ng/mL, Sigma-Aldrich) por 15 minutos a temperatura ambiente. Depois as células foram lavadas com 300 µL de PBS e as lâminas montadas com 30 µL de *Fluoromount*. Os resultados foram obtidos através de microscopia confocal de fluorescência, usando o microscópio confocal Leica modelo TCS-SPE. A representação gráfica da intensidade média de fluorescência foi feita através do software *ImageJ*.

#### **4.9 Análise da viabilidade (MTT)**

O ensaio de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]} é utilizado para avaliar a viabilidade celular. Somente células metabolicamente viáveis são capazes de clivar o anel tetrazólio, transformando-se da cor amarela para cor roxa, chamado formazana {E,Z-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}, cristais insolúveis em água. A produção de cristais de formazana reflete então o estado funcional da célula. Para avaliar a viabilidade dos macrófagos murinos utilizamos o método MTT. Após o lavado peritoneal as células foram semeadas a razão de  $2 \times 10^5$  células/poço e foi incubado por 24 horas a 37 °C. Posteriormente os poços foram lavados e os macrófagos foram cocultivados com as células MT-2 e os linfócitos murinos por 72 horas.

Após o período de cocultivo, os poços foram lavados para remoção das células não aderentes e 20 µL de MTT foi adicionado (5 mg/mL; Sigma-Aldrich) às células (em cada poço), e as mesmas foram mantidas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 3 horas. Após

esse período, o sobrenadante (SN) foi desprezado e os cristais de formazana que foram formados pela redução do MTT foram dissolvidos em dimetilssulfóxido (DMSO; Reagen). A leitura da viabilidade foi realizada por colorimetria em um leitor de microplacas (*SpectraMax® Paradigm®*) no comprimento de onda de 490 nm.

#### **4.10 Análise da viabilidade celular (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  $\text{NAD}^+$  como cofator e encontra-se presente nas mais variadas células do corpo. Em situações onde a célula se rompa, ela será então liberada para o meio extracelular podendo ser indicativo, portanto, de morte celular. Para o ensaio de morte celular por liberação de LDH, os explantes neurais foram semeados em placas de 24 poços. As células foram deixadas em cultura por diferentes períodos. Em seguida, o sobrenadante foi recolhido e o protocolo de dosagem foi executado segundo o fabricante do Kit de dosagem de LDH (DOLES). Para tal, 25  $\mu\text{l}$  de amostra (SN) em uma placa de 96 poços, em seguida foi adicionado 100  $\mu\text{l}$  em cada poço do substrato, 5  $\mu\text{l}$  de alumínio férrico e incubado em banho Maria a 37 °C por 3 minutos ao abrigo da luz. Após a incubação foi adicionado 6  $\mu\text{l}$  de NAD-FMS e incubado em banho Maria a 37 °C por 6 minutos ao abrigo da luz. A reação foi parada com 100  $\mu\text{l}$  de solução estabilizadora e então a absorbância lida em um leitor de microplacas (*SpectraMax® Paradigm®*) no comprimento de onda de 490 nm.

#### **4.11 Quantificação de citocinas por ELISA**

A produção de  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL-1}\beta$  murino foi avaliada nos sobrenadantes dos cocultivos de macrófagos com as células MT-2, ou com linfócitos murinos. A dosagem de citocinas foi realizada pelo teste de ELISA (*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*). Para tal, placas de 96 poços foram inicialmente sensibilizadas com o anticorpo de captura na concentração exigida pelo fornecedor (R&D) (volume final = 25  $\mu\text{L}$ ), previamente diluído em PBS e incubado *overnight* a 4 °C. Os poços foram lavados de três vezes com 200  $\mu\text{L}$  de *Wash buffer*, removendo totalmente o líquido e em seguida foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  de solução de bloqueio (PBS + 1% BSA) por 1 hora à temperatura ambiente e os poços foram lavados. A curva padrão foi montada com citocina recombinante específico para cada kit, partindo da concentração de 2000 e/ou 1000 pg/ml, as amostras foram adicionadas ( $V_f = 25 \mu\text{L}$ ) e incubadas *overnight*. Após as lavagens, foi adicionado 25  $\mu\text{L}$  do anticorpo de detecção e após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, os poços foram lavados e adicionados com 25  $\mu\text{L}$  de Estreptoavidina-HRP (R&D 1:200) e após 20 minutos de incubação, os poços foram lavados. Foi adicionado 25



$\mu\text{L}$  do substrato e após incubação por 20 minutos à temperatura ambiente protegido de luz, adicionado 50  $\mu\text{L}$  de *stop solution*. A leitura foi realizada por colorimetria em leitor de microplacas (*SpectraMax® Paradigm®*) em comprimento de onda de 450 nm. As análises foram feitas em Software *Prism 6.0*.

#### **4.12 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs)**

A detecção da liberação de EROs foi realizada através da incubação com a sonda Dihidrorodamina (DHR) 123 (Invitrogen/Termofisher). Para os experimentos foram utilizados os macrófagos após 72 horas de cocultivo com as células MT-2. O controle positivo foi incubado com PMA (100 nM) por 1 hora a 37 °C. Em seguida foram adicionados a DHR (20  $\mu\text{M}$ ) por 15 minutos a 37 °C. Os poços foram lavados com PBS e a leitura foi realizada através do leitor de microplacas (*SpectraMax® Paradigm®*) em comprimento de onda de 485 nm (excitação) e 538 nm (emissão). As análises foram feitas em Software *Prism 6.0*.

#### **4.13 Ensaio de quantificação de dsDNA**

Os macrófagos foram cocultivados com os linfócitos murinos e com as células MT-2 por 4 horas com meio RPMI sem SFB a 37 °C. Após esse período as células em suspensão foram retiradas dos poços, centrifugadas e o sobrenadante foi recolhido. Em seguida, 25  $\mu\text{L}$  de Tampão TE, 25  $\mu\text{L}$  das amostras e 50  $\mu\text{L}$  de PicoGreen diluído 200x (Invitrogen) foram adicionados em uma placa de 96 poços opaca. O resultado foi obtido através do leitor de microplacas (*SpectraMax® Paradigm®*) em comprimento de onda de 485 nm (excitação) e 538 nm (emissão). As análises foram feitas em Software *Prism 6.0*.

#### **4.14 Ensaio de Fagocitose**

Após o cocultivo dos macrófagos murinos com as células MT-2 e com linfócitos murinos por 72 horas, os poços foram lavados e as células foram incubadas com Dextran 70 kDa (0,25 mg/mL) e PMA (100 nM) por 1 hora a 37 °C. Após esse período os poços foram lavados e a leitura foi realizada através do leitor de microplacas (*SpectraMax® Paradigm®*) em comprimento de onda de 485 nm (excitação) e 538 nm (emissão). As análises foram feitas em Software *Prism 6.0*.

#### **4.15 Análise estatística**

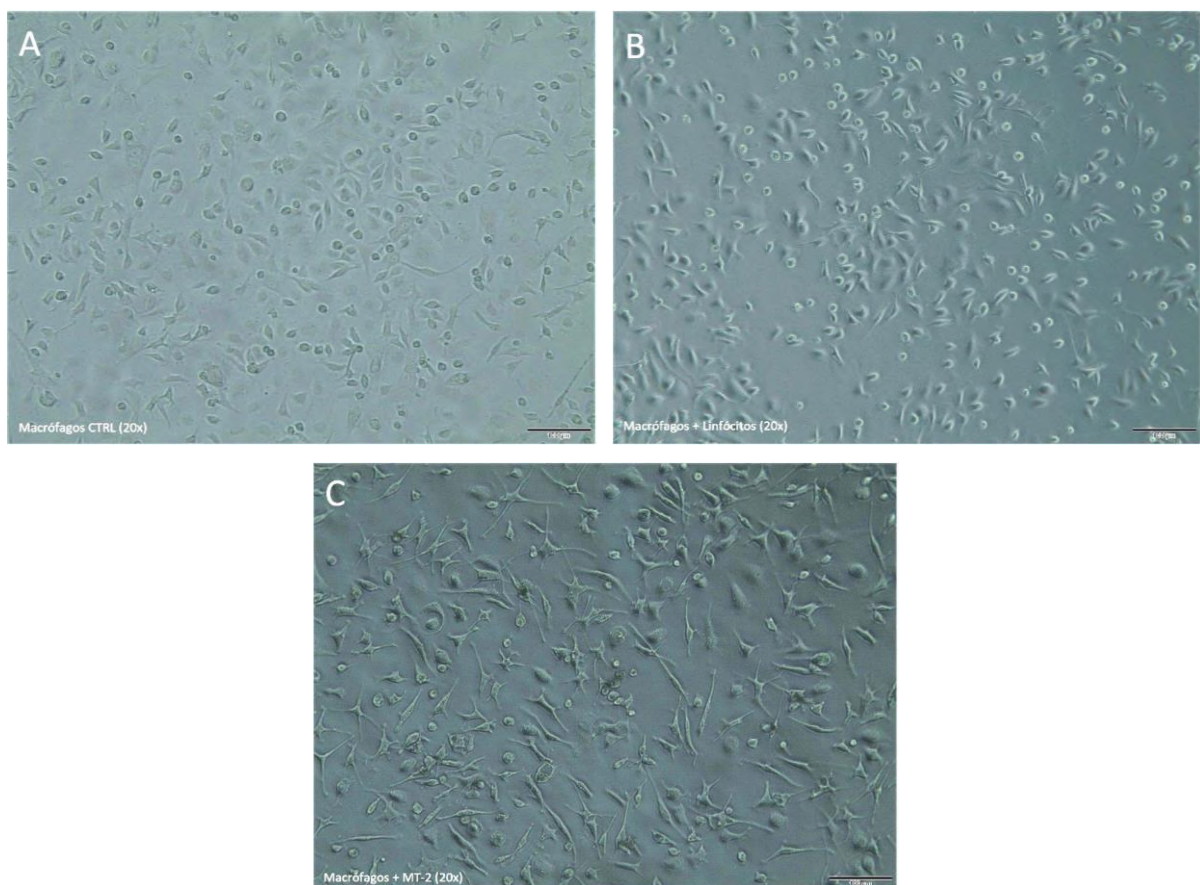
Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média. Os resultados foram analisados quanto a sua distribuição da amostra era normal teste Kolmogorov-Smirnov. Para as amostras com distribuição normal utilizamos a análise de variância unidirecional (one-way ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. E para as amostras com distribuição não normal

utilizamos o teste Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Os valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas foram feitas no programa GraphPad Prism 5.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 A presença de células MT-2 na cultura altera a morfologia de macrófagos peritoneais

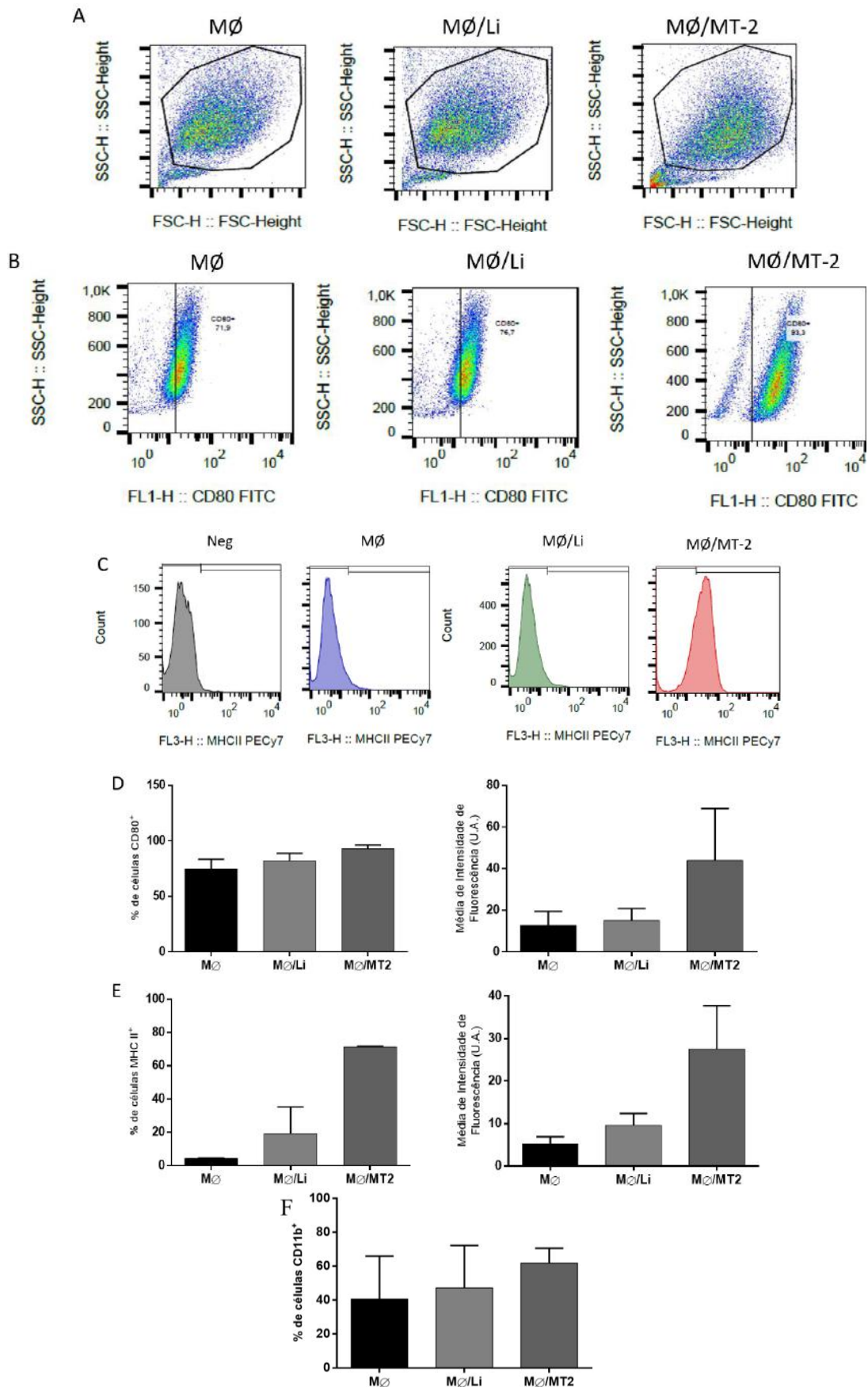
Inicialmente, avaliamos a morfologia dos macrófagos murinos após o cocultivo de 72 horas com as células MT-2. Para tal, foram tiradas fotos das culturas, utilizando microscópio óptico. Após o período de incubação foi possível observar que os macrófagos cocultivados na presença das células MT-2 exibiram morfologia celular com aspectos dendríticos (**Figura 14 C**), enquanto que os macrófagos cocultivados somente com meio de cultura ou com linfócitos murinos, apresentaram morfologia arredondada e/ou em forma de fuso (**Figura 14 A e B**).



**Figura 14. Análise morfológica da cultura de MØ/MT-2.** Foi realizado lavado peritoneal em camundongos Swiss e foram semeadas  $5 \times 10^6$  células/poço em placas de 6 poços. Após 24 h os macrófagos enriquecidos foram cocultivados com as células MT-2 e os linfócitos, murinos irradiados (20 Gy), na proporção 1:2. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 72 h. Em seguida, os poços foram lavados para retirar os linfócitos e as células MT-2. A morfologia das células foi avaliada através de microscopia óptica. (A) macrófagos controle; (B) macrófagos cocultivados com linfócitos murinos; (C) macrófagos cocultivados com as células MT-2. Barra de escala = 100 µm.

## 5.2 O cocultivo de macrófagos peritoneais com as células MT-2 promove alteração na expressão de MHC e CD80

A alteração da morfologia dos macrófagos após o cocultivo com as células MT-2 sugere que a célula esteja passando por um processo de ativação celular. Pensando nisso, foi realizada uma imunofenotipagem, através da metodologia de citometria de fluxo. Previamente, identificamos que dentro da região delimitada como macrófagos e representada na figura 15 cerca de 70% das células foram identificadas com células F4/80<sup>+</sup> nos três grupos experimentais (dados não mostrados). Na figura 15, podemos observar que a incubação dos macrófagos com os linfócitos alogeneicos não promoveu alteração na expressão das moléculas de superfície analisadas. Entretanto, não foram observados aumentos expressivos no percentual de células expressando as moléculas CD80 (MØ: 74,83±8,67%; MØ/Li: 82,00±6,85%; MØ/MT2: 93,10±3,17), mas houve aumento no percentual de células expressando MHC-II (MØ: 4,36±0,17%; MØ/Li: 19,18±16,13%; MØ/MT2: 71,25±0,55) em macrófagos cocultivados com as células MT-2 (**Figura 15 A-E**). Pode ser observado um aumento no nível de expressão através do aumento da média de intensidade de fluorescência tanto para o CD80 quanto para o MHC II (**Figura 15 D-E**). No entanto, não houve diferenças na expressão de CD11b (**Figura 15 F**).

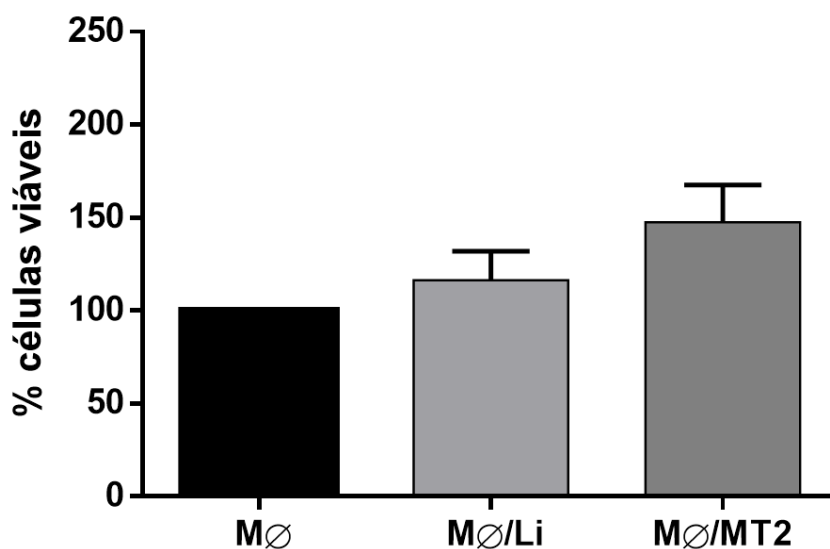


**Figura 15. Análise da expressão de CD80 e MHC-II por citometria de fluxo.** Foi realizado lavado peritoneal em camundongos Swiss e foram semeadas  $5 \times 10^6$  células/poço em placas de 6 poços. Após 24 h os macrófagos

enriquecidos foram cocultivados com as células MT-2 e os linfócitos, obtidos dos linfonodos murinos, irradiados (20 Gy) na proporção 1:2. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% CO<sub>2</sub> por 72 h. Em seguida, os poços foram lavados para retirar as células em suspensão e os macrófagos foram incubados por mais 24 h somente com meio de cultura. Os macrófagos foram soltos da placa utilizando PBS + EDTA 1 mM gelado. As células foram centrifugadas, bloqueadas com PBS + 1% SFB por 15 minutos e foram marcadas com anti-CD80 FITC, anti-MHCII PECy7 e anti-CD11b APC por 30 minutos a 4 °C. As células foram lavadas e ressuspensas em PBS. As células foram lavadas e adquiridas no citômetro de fluxo. (A) Representação da montagem da *gate* analisada. (B) Número relativo de células CD80<sup>+</sup>. (C) Histograma referente ao número de células MHC-II<sup>+</sup>. (D e E) Gráficos da média ± SEM da porcentagem e da intensidade média de fluorescência das células CD80<sup>+</sup> e MHC-II<sup>+</sup>, respectivamente (2 experimentos realizados de forma independente). (F) Gráfico da média ± SEM da porcentagem de células CD11b<sup>+</sup> (3 experimentos realizados de forma independente).

### 5.3 O cocultivo de macrófagos peritoneais com as células MT-2 não altera a viabilidade celular dos macrófagos

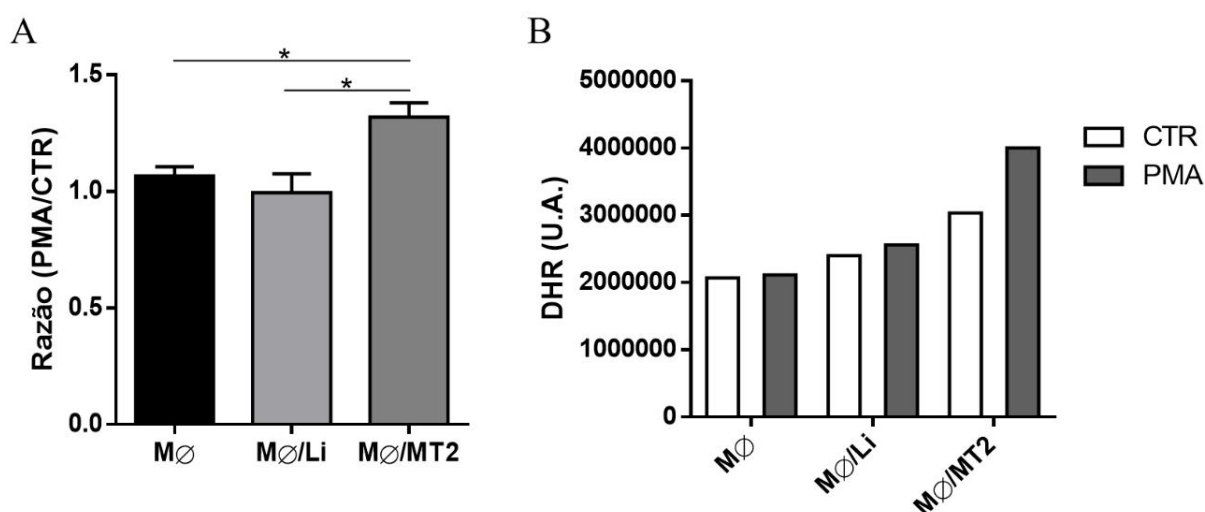
Para confirmar que os efeitos observados até então não foram decorrentes de um processo de morte celular, foi realizado um ensaio de viabilidade colorimétrico (ensaio MTT) para avaliar a atividade metabólica dos macrófagos após o cocultivo com as células MT-2. Os resultados obtidos demonstram que não há redução significativa na porcentagem de células viáveis, ou seja, os macrófagos obtidos do lavado peritoneal de camundongos após o cocultivo de 72 horas com as células MT-2 permanecem metabolicamente funcionais (**Figura 16**).



**Figura 16. Análise da viabilidade da cultura de MØ/MT-2.** Foi realizado lavado peritoneal em camundongos Swiss e foram semeadas  $2 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços. Após 24 h os macrófagos enriquecidos foram cocultivados com as células MT-2 e os linfócitos, obtidos dos linfonodos murinos, irradiados (20 Gy) na proporção 1:2. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% CO<sub>2</sub> por 72 h. Em seguida, os poços foram lavados para retirar os linfócitos e as células MT-2 e foram adicionados 20 µl de MTT. Após 3 h, o sobrenadante foi desprezado e os cristais de formazana foram dissolvidos em DMSO. A leitura da viabilidade foi realizada em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 490 nm. O gráfico representa a média ± SEM de três experimentos realizados de forma independente.

#### 5.4 A presença de células MT-2 na cultura modifica a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) dos macrófagos

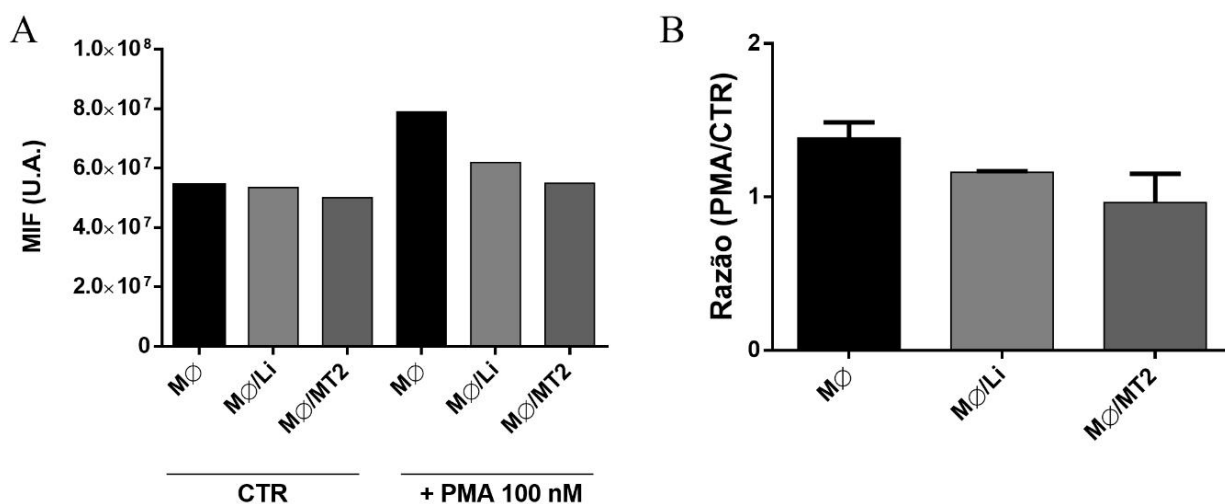
Visto que os macrófagos murinos apresentaram mudanças morfológicas e fenotípicas após o cocultivo com as células MT-2, foram realizados experimentos para determinar se os macrófagos estariam apresentando alterações funcionais. Os macrófagos obtidos através de lavado peritoneal foram cocultivados com as células MT-2 e com linfócitos dos camundongos por 72 horas. Após esse período as células foram ou não estimuladas com PMA por 1 hora. Depois os poços foram lavados e a sonda fluorescente DHR, utilizada para a detecção EROs, foi adicionada por 15 minutos. Foi observado que os macrófagos cocultivados com as células MT-2 apresentaram maior produção de espécies reativas de oxigênio quando comparados com os grupos controles (MØ e MØ/Li) (**Figura 17**).



**Figura 17. Detecção de espécies reativas de oxigênio da cultura de MØ/MT-2.** Foi realizado lavado peritoneal em camundongos Swiss e foram semeadas  $2 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços. Após 24 h os macrófagos enriquecidos foram cocultivados com as células MT-2 e os linfócitos, obtidos dos linfonodos murinos, irradiados (20 Gy) na proporção 1:2. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% CO<sub>2</sub> por 72 h. Em seguida, os macrófagos foram ou não estimulados com PMA (100 nM) por 1 h a 37 °C. Depois os poços foram lavados e foi adicionado a sonda fluorescente DHR (20 nM) por 15 minutos a 37 °C. Os poços foram lavados com PBS e o resultado foi obtido através do espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 538 nm (emissão). (A) Gráfico da média  $\pm$  SEM da razão entre as células estimuladas com PMA e as células não estimuladas (3 experimentos realizados de forma independente). (B) Gráfico representativo de um experimento realizado em duplicata. \* $p < 0,05$  em relação aos controles (MØ e MØ/Li).

#### 5.5 O cocultivo de macrófagos peritoneais com as células MT-2 não altera a capacidade fagocítica

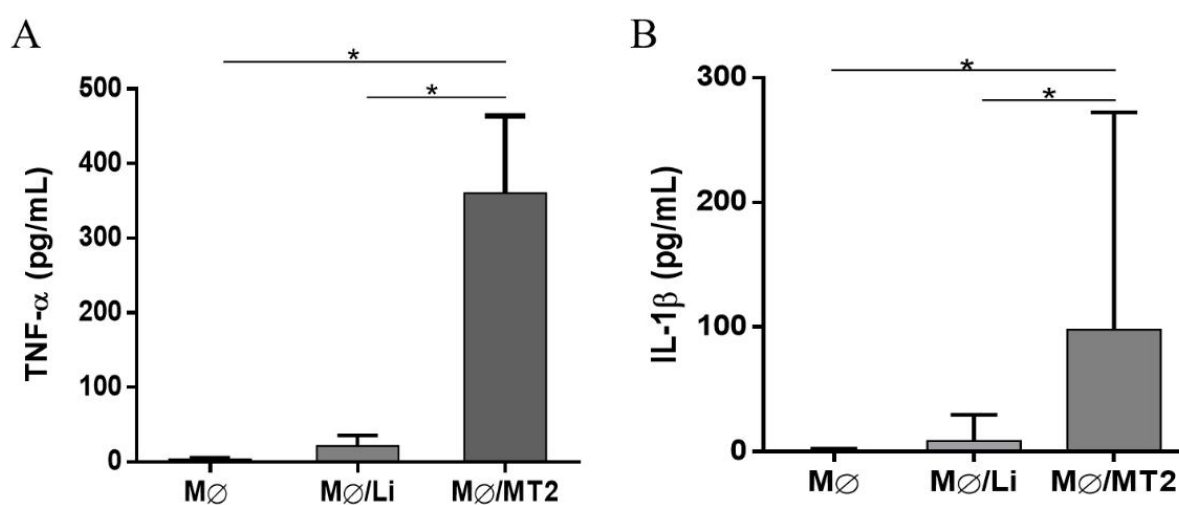
Para avaliar a capacidade fagocítica dos macrófagos foi realizado um ensaio de fagocitose utilizando Dextran-FITC (70 kDa). Os macrófagos peritoneais murinos foram cocultivados com as células MT-2 e após 72 horas foram ou não incubados com PMA e Dextran por 1 hora a 37 °C. Foi possível observar que não houve diferença na atividade fagocítica dos macrófagos cocultivados na presença das células MT-2 (**Figura 18**).



**Figura 18. Ensaio de fagocitose de MØ/MT-2.** Foi realizado lavado peritoneal em camundongos Swiss e foram semeadas  $2 \times 10^5$  células/poço em placas de 96 poços. Após 24 h os macrófagos enriquecidos foram cocultivados com as células MT-2 e os linfócitos, obtidos dos linfonodos murinos, irradiados (20 Gy) na proporção 1:2. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% CO<sub>2</sub> por 72 h. Em seguida, os macrófagos foram ou não incubados com PMA (100 nM) e Dextran (70 kDa) por 1 h a 37 °C. Os poços foram lavados com PBS e o resultado foi obtido através do espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 485 nm (excitação) e 538 nm (emissão). (A) Gráfico representativo de um experimento realizado em duplicata. (B) Gráfico da média  $\pm$  SEM da razão entre as células estimuladas com PMA e as células não estimuladas (2 experimentos realizados de forma independente).

### 5.6 A presença células MT-2 na cultura induz a produção de citocinas por macrófagos

A fim de confirmar as alterações funcionais e o perfil ativado dos macrófagos cultivados na presença das células MT-2, avaliamos a produção das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Nossos resultados indicam que macrófagos peritoneais após o cocultivo com as células MT-2 produzem altos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Figura 19).

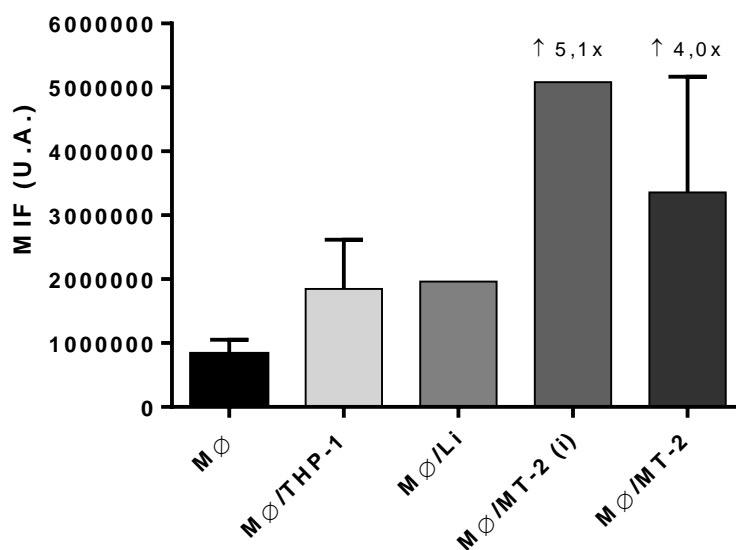


**Figura 19. Quantificação de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no sobrenadante da cultura de MØ/MT-2.** Foi realizado lavado peritoneal em camundongos Swiss e foram semeadas em placas de 6 ou 96 poços. Após 24 h os macrófagos enriquecidos foram cocultivados com as células MT-2 e os linfócitos, obtidos dos linfonodos murinos, irradiados (20 Gy) na proporção 1:2. As células foram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% CO<sub>2</sub> por 72 h. Em

seguida, as células em suspensão foram coletadas e centrifugadas. A detecção das citocinas no sobrenadante da cocultura (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) foi realizada segundo o protocolo descrito pelo fabricante. O resultado foi obtido através do leitor de microplacas no comprimento de onda de 450 nm e as análises foram realizadas em Software Prisma 6.0. Os gráficos são valores de média  $\pm$  SEM de sobrenadantes de 6 ou 8 experimentos realizados de forma independente. \*p<0,05 em relação aos controles (M $\emptyset$  e M $\emptyset$ /Li).

### 5.7 Macrófagos cocultivados com a MT-2 são capazes de liberar redes extracelulares de DNA

Macrófagos também são capazes de liberar redes extracelulares de DNA como mecanismo microbicida (Doster *et al.*, 2018). Foram realizados ensaios para quantificação de DNA dupla fita presente no sobrenadante da cocultura de macrófagos peritoneais com as células MT-2. Para a quantificação foi utilizado o kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA e 25  $\mu$ L de cada amostras. Após 4 horas de incubação foi observada uma presença aumentada de DNA dupla fita nos sobrenadantes da cocultura de macrófagos murinos com as células MT-2 irradiadas (5 vezes mais DNA) ou células não irradiadas (4 vezes mais DNA). Esse aumento pode ser observado em ambos os grupos de macrófagos cultivados com MT-2, porém não ocorreu nos grupos controle, sugerindo que parte dos macrófagos pode ser capaz de liberar redes extracelulares de DNA (**Figura 20**).

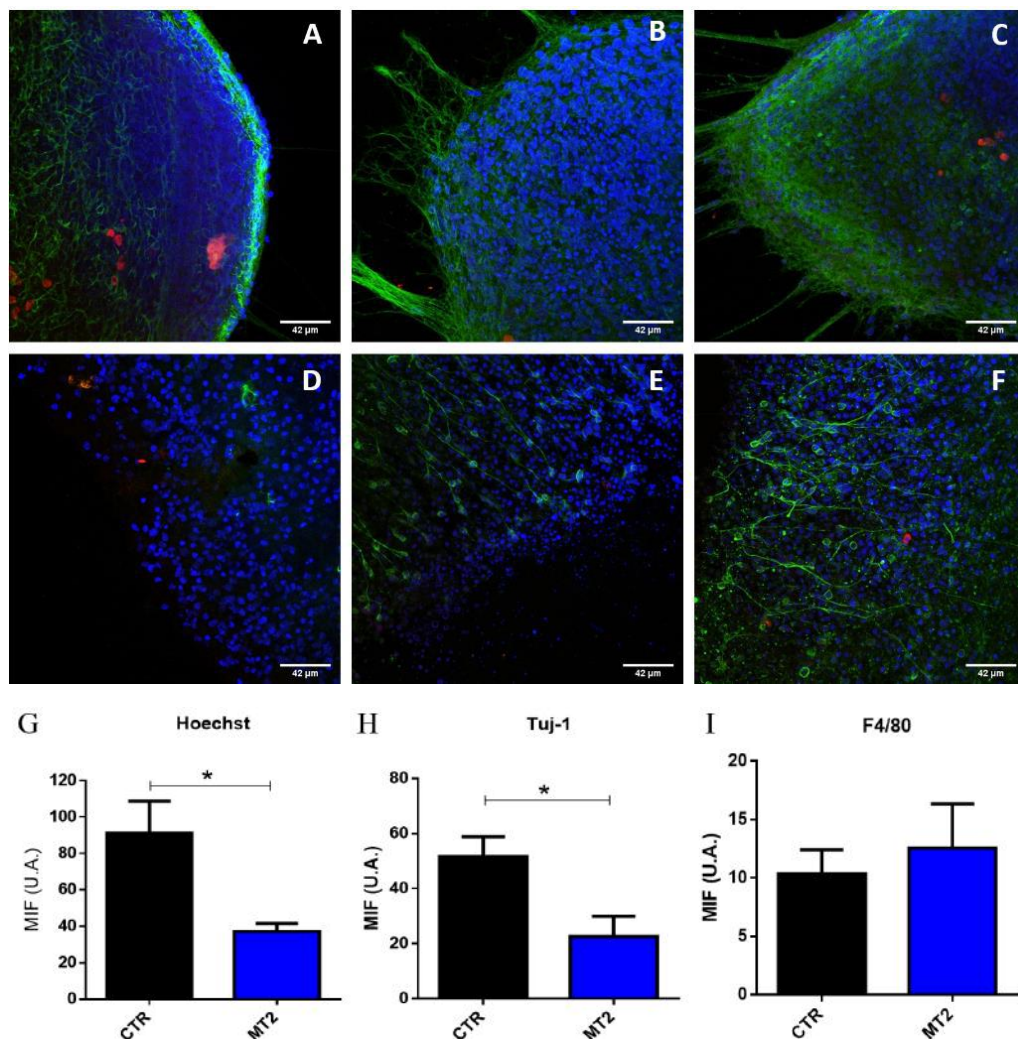


**Figura 20. Detecção de DNA dupla-fita no sobrenadante da cocultura de M $\emptyset$ /MT-2.** As células obtidas através do lavado peritoneal de camundongos Swiss foram semeadas a razão de  $2 \times 10^5$  células/poço e foram incubadas por 24 h a 37 °C. Os macrófagos foram enriquecidos e cocultivados na presença ou ausência de células MT-2 e linfócitos murinos irradiados, e células THP-1 e células MT-2 não irradiados na proporção 1:2 em meio RPMI sem SFB. As células foram incubadas por 4 h a 37 °C. Em seguida, as células em suspensão foram retiradas do sobrenadante por centrifugação. O ensaio de quantificação do DNA presente no sobrenadante foi feita utilizando o reagente Picogreen e placas de 96 poços com fundo opaco. O resultado foi obtido por fluorescência utilizando espectrofotômetro em comprimento de onda de 485 nm (excitação) e 538 nm (emissão). Os gráficos são valores de média  $\pm$  SEM de sobrenadantes de 1 ou 2 experimentos realizados de forma independente realizados em duplicata.



## 5.8 Efeito do cocultivo de MØ/MT-2 com explantes de medula espinhal

O contato dos macrófagos com as células infectadas pelo HTLV-1 promove alterações fenotípicas e funcionais nestas células. Acreditamos que o contato desses macrófagos com SNC pode promover efeitos deletérios, assim avaliamos o efeito do cocultivo de MØ/MT-2 com explantes de medula espinhal. Os resultados obtidos através de microscopia confocal de fluorescência sugerem que macrófagos, provenientes de lavado peritoneal, quando cocultivados com células MT-2, adquirem capacidade para causar danos às células do tecido nervoso murino (**Figura 21**). Isto pode ser observado através da comparação dos explantes de medula que foram cocultivados com macrófagos controles (**Figura 21 A, B e C**) com os explantes cocultivados com MØ/MT-2 (**Figura 21 D, E e F**). É possível observar nas imagens a formação de núcleos picnóticos e a diminuição na marcação em verde, sugerindo a destruição e/ou desorganização da tubulina neural. A intensidade média de fluorescência dos marcadores confirma o observado pela microscopia (**Figura 21 G, H e I**).

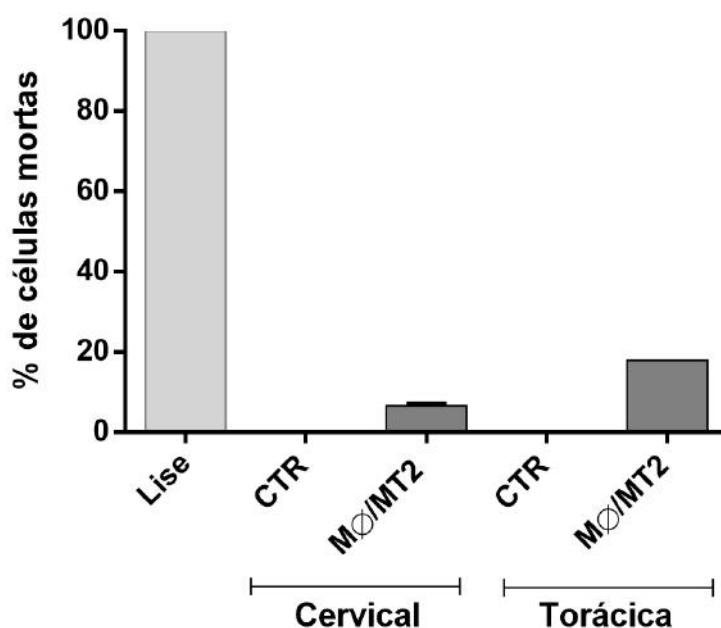


**Figura 21.** Análise do cocultivo dos explantes neurais embrionários com MØ/MT-2. Foi feito um lavado peritoneal em camundongos C57BL/6 selvagens e adultos. As células foram semeadas a razão de  $5 \times 10^6$

células/poço e incubadas na presença ou na ausência de as células MT-2 irradiadas com 20 Gy na proporção 1:3. As células foram incubadas por 72 h nas mesmas condições. Após esse período, os macrófagos foram ( $5 \times 10^4$  células/poço) cocultivados com os explantes de medula espinhal de embrião de camundongo. As culturas foram incubadas por 72 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o explante foi marcado com F4/80 conjugado com APC (vermelho), Tuj (verde) e Hoescht (azul). O resultado foi observado através de microscopia confocal de fluorescência. (A, B e C) são imagens referentes aos explantes com macrófagos não cocultivados com MT-2 (controles), (D, E e F) são explantes com MØ/MT-2. (G) Intensidade média de fluorescência do núcleo, (H) tubulina neural e (I) fagócitos mononucleares. \* $p < 0.05$  com relação ao controle. Os resultados são referentes a um  $n=6$  controles e MØ/MT-2.

### 5.9 Efeito do cocultivo de MØ/MT-2 sobre a viabilidade da cultura de células neurais

Como os pacientes com MAH/PET apresentam atrofia na porção torácica da medula espinhal, pensamos que a indução de lesão poderia ser diferente quando comparados com outras porções da medula. Então, foi realizado a dosagem de LDH no sobrenadante da cultura de explantes neurais com os MØ/MT-2. Os resultados sugerem que macrófagos cocultivados com MT-2 levam a morte das células neurais sem que ocorra a liberação de LDH para o meio de cultura, uma vez que, a detecção dessa enzima foi considerada baixa quando comparado com o controle com 100% das células lisadas. Entretanto, foi possível observar que o efeito deletério desencadeado pelo cocultivo com MØ/MT-2, foi mais evidente na porção torácica da medula espinhal murina (**Figura 22**).



**Figura 22. Análise da viabilidade de explantes neurais cocultivadas com MØ/MT-2.** Foi feito um lavado peritoneal em camundongos C57BL/6 selvagens e adultos. As células foram semeadas a razão de  $5 \times 10^6$  células/poço e incubadas na presença ou na ausência de as células MT-2 irradiadas com 20 Gy na proporção 1:3. As células foram incubadas por 72 h nas mesmas condições. Após esse período os macrófagos foram ( $5 \times 10^4$  células/poço) cocultivados com os explantes de medula espinhal (cervical e torácica) de embrião de camundongo. Foram incubados por 72 h a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o sobrenadante da cultura foi coletado e foi feito a dosagem de LDH utilizando kit comercial. Os resultados são referentes a um  $n=2$  controles e MØ/MT-2.

## 6. DISCUSSÃO

Estima-se que, aproximadamente, entre 5 e 10 milhões de pessoas no mundo sejam portadoras do HTLV-1, estando a maior parte destes indivíduos aqui no Brasil (Catalan-Soares, Carneiro-Proietti e Proietti, 2005; Gessain e Cassar, 2012). A infecção crônica pelo HTLV-1 é capaz de induzir o desenvolvimento de manifestações clínicas de caráter inflamatório, sendo a principal delas a MAH/PET, uma doença inflamatória crônica e neurodegenerativa (Olière *et al.*, 2011). O HTLV-1 tem como principal alvo linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Entretanto, esse vírus também é capaz de infectar linfócitos T CD8<sup>+</sup>, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células da microglia. Pouco se sabe sobre o papel dos macrófagos na infecção pelo HTLV-1, mas sabe-se que podem ser infectados pelo vírus *in vitro* ou *in vivo* e já se tem algumas evidências que sugerem que essas células podem migrar da periferia para a medula espinhal em pacientes com MAH/PET (Koyanagi, 1993; Enose-Akahata *et al.*, 2012).

Os macrófagos possuem uma grande diversidade de aspectos morfológicos e funcionais variando de acordo com o tecido onde se encontram (Mills *et al.*, 2000; Mosser 2003; Mantovani *et al.*, 2004; Gordon e Taylor, 2005). De modo geral, esses fagócitos são caracterizados fenotipicamente pela alta expressão de F4/80 e CD11b. Entretanto, a expressão dessas moléculas pode variar de acordo com cada subpopulação de macrófagos (Taylor *et al.*, 2003). Os macrófagos peritoneais residentes, são obtidos da cavidade peritoneal e enriquecidos por aderência em placas de cultura. Os macrófagos podem ser polarizados em M1 e M2 de acordo com sua função e metabolismo (Mills *et al.*, 2000). Os macrófagos M1 apresentam uma morfologia “dendrítica”, com grandes prolongamentos, enquanto os macrófagos M2 apresentam uma morfologia arredondada e/ou fusiforme, semelhante à dos macrófagos não estimulados (Ploeger *et al.*, 2013). Quando polarizadas para perfil M1, essas células têm como característica a capacidade de apresentar antígenos, alta produção de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Ginderachter *et al.*, 2006; Kadl *et al.*, 2010). Além disso, expressam altos níveis do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II), o marcador CD68 e as moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e CD40 (MacMicking *et al.*, 1997; Arnold *et al.*, 2014; Vogel *et al.*, 2014).

O presente estudo demonstrou que macrófagos peritoneais, obtidos de camundongos, após o cocultivo de 72 horas com os linfócitos T CD4 infectados pelo HTLV-1, apresentaram morfologia indicativa de ativação quando comparados com macrófagos cultivados apenas com meio de cultura e com linfócitos murinos. A partir dessas observações foram realizados ensaios de imunofenotipagem para determinar o perfil de ativação desses macrófagos. Para isso, foram utilizados marcadores específicos para identificação de macrófagos M1. Foram observados

maior expressão de CD80 e MHC-II por macrófagos cocultivados com as células MT-2 e não houve alterações nos níveis de CD11b. Os resultados obtidos sugerem que as células MT-2 induzem a polarização dos macrófagos murinos para o perfil M1. A alteração fenotípica dos macrófagos pode ser decorrente da ação de produtos secretados pelas células MT-2 e/ou da infecção dos macrófagos pelo HTLV-1.

O cocultivo dos macrófagos com as células MT-2 poderia resultar na perda de viabilidade desses fagócitos e isso poderia impactar nos níveis de expressão de alguns marcadores celulares. Pensando nisso, foram realizados ensaios para determinar o número de macrófagos viáveis após a cocultura. Os resultados obtidos sugerem que o cocultivo dos macrófagos peritoneais murinos com as células MT-2 por 72 horas não reduziram significativamente a taxa de células metabolicamente viáveis.

O estresse oxidativo está associado a patogênese de doenças graves como câncer, doenças autoimunes e neurodegenerativas. O estresse oxidativo é causado pela presença intracelular de espécies reativas de oxigênio, que excede a defesa antioxidante da célula (Schieber e Chandel, 2014). As fortes propriedades oxidantes das EROs resultam em danos a estruturas intracelulares em estruturas como proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (Birben *et al.*, 2012; Schieber e Chandel, 2014; Holmström e Finkel, 2014). As EROs são consideradas há muito tempo importantes mediadores antimicrobianos produzidos por macrófagos. E também são essenciais para a indução e manutenção da polarização de macrófagos do tipo M1. Vários estudos relataram o papel da ERO na ativação de NF- $\kappa$ B e em vias de sinalização que promovem a expressão de genes pró-inflamatória em macrófagos (Pawate *et al.*, 2004; Kohchi *et al.*, 2009; Padgett *et al.*, 2015). Já se tem descrito que umas das funções da Tax, proteína expressa por células infectadas pelo HTLV-1, envolve a estimulação da produção de EROs (Takahashi *et al.*, 2013). Além disso, marcadores de estresse oxidativo foram elevados em soros de pacientes com esclerose múltipla (Naidoo *et al.*, 1992; Glabiński *et al.*, 1993; Besler *et al.*, 2003) e no SNC de animais com EAE (Hunter *et al.*, 1985; MacMicking *et al.*, 1992). Em pacientes com esclerose múltipla, demonstrou-se que as EROs induzem danos ao DNA, levando à neurodegeneração (Vladimirova *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2000).

No presente estudo foi demonstrado aumento na produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos peritoneais murinos após a cocultura com células MT-2. O aumento da produção de EROs sugere que esses macrófagos tenham um importante papel no desencadeamento das lesões observadas durante o processo inflamatório característico da MAH/PET. Tendo em vista que as EROs podem causar danos celulares que potencializam o processo inflamatório.

Acreditamos que os macrófagos cultivados somente com meio de cultura estimulados com PMA não apresentaram aumento na produção de EROs devido ao longo período de 72 horas de cultivo, onde as células ficaram “inertes”. Não achamos que foi um problema com o estímulo, uma vez que, os macrófagos que foram cocultivados com as células MT-2 aumentaram a produção de EROs após o tratamento com PMA.

As linhagens de células MT-2 são capazes de secretar altos níveis de citocinas como, por exemplo, IFN- $\gamma$  (Nomura *et al.*, 2019). Essa molécula estimula a produção de outras citocinas e aumenta a capacidade fagocítica de monócitos (Nathan *et al.*, 1983). Além disso, o IFN- $\gamma$  é a principal citocina conhecida por ativar macrófagos/monócitos, bem como a sua alta produção é observada em indivíduos infectados com HTLV-1. Deste modo, pensamos que, para o nosso modelo de estudo, os macrófagos peritoneais murinos poderiam apresentar maior capacidade fagocítica. Entretanto, em nosso estudo foi observado que os macrófagos peritoneais mantêm sua capacidade fagocítica inalterada após o cocultivo com as células MT-2. Corroborando com esses resultados, Amorim e colaboradores (2014) demonstraram que macrófagos obtidos a partir da diferenciação de monócitos de sangue periférico de pacientes com HTLV-1 não apresentaram alterações na sua capacidade fagocítica.

O desenvolvimento de disfunção cognitiva relacionada ao HTLV-1 pode estar associado à infecção viral e/ou a resposta inflamatória promovida por células do sistema imune ativadas e/ou infectadas. Níveis mais altos de algumas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  foram associados à disfunção cognitiva em idosos e em pacientes com doenças reumatológicas (Kozora *et al.*, 2001; Dik *et al.*, 2005; Mcafoose *et al.*, 2009). O aumento de níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  também já foi associado ao déficit cognitivo da infecção causada pelo vírus da hepatite C, doença de Alzheimer e depressão (Hilsabeck *et al.*, 2010; Spanemberg *et al.*, 2014; Dursun *et al.*, 2015). A produção de algumas citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  por células T, macrófagos, e micróglias ativadas possuem grande importância na desmielinização neuronal, como as que ocorrem inicialmente em pacientes com MAH/PET (Grant *et al.*, 2002). Deste modo, dosamos TNF- $\alpha$  no sobrenadante da cocultura de macrófagos murinos com as células MT-2. Observamos que os macrófagos após o cocultivo com as células MT-2 produzem níveis, significativamente, altos de TNF- $\alpha$  quando comparados com os macrófagos controle. Esse resultado sugere que os macrófagos podem ter um importante papel durante o desencadeamento de lesão neurológica característica do MAH/PET, uma vez que, o TNF- $\alpha$  está associado a diversos fatores relacionados com déficit cognitivo e está elevado no líquido de pacientes com MAH/PET (Champs *et al.*, 2019).

A citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ , tem importante papel na resposta a diversos patógenos. Entretanto, ela também pode ser prejudicial ao indivíduo, estando associada ao dano tecidual e a diversas doenças. Por conta desse papel divergente, sua produção e secreção é um processo cuidadosamente controlado dentro das células (Bent *et al.*, 2018). Diversos trabalhos demonstraram que a secreção dessa citocina pode ser induzido pela presença de inúmeros patógenos, inclusive em infecções virais. Dados do nosso grupo demonstraram que monócitos obtidos de sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam maior produção e secreção IL-1 $\beta$  (Albuquerque, 2018). Deste modo, resolvemos dosar os níveis de IL-1 $\beta$  no sobrenadante da cocultura de macrófagos e células MT-2, a fim de definir se o cocultivo com as células infectadas pelo HTLV-1 seria o suficiente para induzir a produção dessa citocina pró-inflamatória. Foi observado um aumento significativo entre os níveis dessa molécula presente no sobrenadante, quando comparados com os grupos controles. Esse resultado corrobora com os resultados anteriores indicando que esses fagócitos apresentam características semelhantes aos macrófagos polarizados para o perfil M1. Sendo assim, essas células podem ter um papel importante durante o desencadeamento da lesão neurológica causada pelo HTLV-1. Esse evento está relacionado com a produção de óxido nítrico e TNF- $\alpha$ , através da ativação de NF- $\kappa$ B, por astrócitos estimulados por IL-1 $\beta$  (Zhao *et al.*, 2001). Além disso, o TNF- $\alpha$  pode induzir a expressão de iNOS, quando em cooperação com IL-1 $\beta$  (Saha e Pahan, 2003; Jana *et al.*, 2005). A formação do iNOS resulta na produção de óxido nítrico, que é tóxico para os neurônios, além de aumentar a permeabilidade da BHE (Chao *et al.*, 1996; Nottet, 2005).

Alguns macrófagos possuem a capacidade de liberar redes de DNA, semelhantes aos liberados por neutrófilos, para executar sua função microbicida (Doster *et al.*, 2018). Pensando nisso, resolvemos dosar o DNA dupla fita presente no sobrenadante da cocultura entre macrófagos e outros tipos celulares. Observamos que os macrófagos cocultivados com as células MT-2 por 4 horas apresentaram aumento de 4-5x na quantidade de DNA presente no sobrenadante quando comparados com o controle. Esse resultado foi curioso, pois vários artigos afirmam que a liberação de MET é seguida pela perda de viabilidade dos macrófagos. Entretanto, isso não foi observado nos nossos experimentos. Uma dosagem de LDH feita do sobrenadante dessa cultura mostrou que as taxas de morte celular por necrose foram bem baixas (dados não mostrados). Não sabemos ao certo como essas células podem estar secretando esse DNA nessas condições. Mais experimentos precisam ser feitos para confirmar esse achado.

Em nosso modelo utilizando culturas organotípicas, foi possível observar retração dos neuritos quando cocultivados M $\emptyset$ /MT-2 com explantes murinos embrionários de medula espinhal. Além disso, foi observada uma diminuição na marcação da tubulina e do núcleo dos

neurônios, sugerindo que a presença desses macrófagos induziu lesão no tecido nervoso. Os núcleos apresentaram aspecto característico de condensação da cromatina (núcleo picnótico), indicando apoptose das células do tecido nervoso. Atrelado a isso, a marcação não expressiva de F4/80 sugere que os efeitos observados foram decorrentes de produtos secretados pelos macrófagos, já que os mesmos foram semeados nas bordas dos poços e não se infiltraram nos explantes neurais. Já foi descrito na literatura que a proteína viral Tax secretada pelas células MT-2 induziu retração em células de neuroblastoma (Maldonado *et al.*, 2011). Outras moléculas solúveis, liberadas por células infectadas pelo HTLV-1, como a SEMA-4D, podem alterar a dinâmica do citoesqueleto axonal levando ao colapso dos neuritos (Elhabazi *et al.*, 2003). A molécula SEMA-4D é expressa em baixos níveis por células T, células B, macrófagos, células NK e células dendríticas em repouso, mas podem ser reguladas positivamente após a ativação das mesmas (Nkyimbeng-Takwi e Chapoval, 2011; Takamatsu e Kumanogoh, 2012).

O resultado da dosagem de LDH no sobrenadante das culturas de explante corrobora com o esperado. É conhecido na literatura que o LDH só é liberado em casos de morte por necrose. Nos ensaios realizados no presente estudo, os níveis observados de LDH foram bem baixos quando comparados com as células lisadas. Entretanto, os nossos dados preliminares sugerem que há uma diferença na indução de lesão da região cervical e torácica, uma vez, que houve maior liberação de LDH no sobrenadante dos poços com MØ/MT-2 e explantes de medula da porção torácica. Esse resultado vem de encontro com os dados encontrados na literatura, onde pacientes com MAH/PET apresentam maior atrofia na porção torácica da medula.

## 7. CONCLUSÃO

Desse modo, podemos sugerir que os macrófagos podem estar envolvidos na indução de lesão do SNC. Tendo em vista que essas células, quando em contato com a linhagem de linfócitos T CD4 HTLV-1<sup>+</sup>, se ativam e secretam mediadores inflamatórios potencialmente danosos ao tecido nervoso. Esse processo pode culminar no aparecimento e/ou na progressão de doença neurológica nos indivíduos infectados.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afonso, P. V., Ozden, S., Prevost, M. C., Schmitt, C., Seilhean, D., Weksler, B. e Ceccaldi, P. E. (2007). Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization. *The Journal of Immunology*, 179, 2576-2583.
- Aird, W. C. (2007). Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation research*, 100, 158-173.
- Albrecht, B., Collins, N. D., Burniston, M. T., Nisbet, J. W., Ratner, L., Green, P. L., e Lairmore, M. D. (2000). Human T-lymphotropic virus type 1 open reading frame I p12I is required for efficient viral infectivity in primary lymphocytes. *Journal of virology*, 74, 9828-9835.
- Albuquerque, C. R. (2018). Imunidade Inata ao Vírus Linfotrópico para Células T Humanas do Tipo 1 (HTLV-1): Um Olhar sobre a Ativação de Inflamassomo e a Geração de Redes Extracelulares de Neutrófilos (NET). Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Biofísica) – Centro de ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Alcindor, E., Valderrama, R., Canavaggio, M., Lee, H., Katz, A., Montesinos, C., e Pipia, P. A. (1992). Imaging of human T-lymphotropic virus type I-associated chronic progressive myeloneuropathies. *Neuroradiology*, 35, 69-74.
- Amorim, C. F., Souza, A. S., Diniz, A. G., Carvalho, N. B., Santos, S. B., e Carvalho, E. M. (2014). Functional activity of monocytes and macrophages in HTLV-1 infected subjects. *PLoS neglected tropical diseases*, 8, e3399.
- Azodi, S., Nair, G., Enose-Akahata, Y., Charlip, E., Vellucci, A., Cortese, I., e Reich, D. S. (2017). Imaging spinal cord atrophy in progressive myelopathies: HTLV-I-associated neurological disease (HAM/TSP) and multiple sclerosis (MS). *Annals of neurology*, 82, 719-728.
- Baltimore D. Expression of Animal Virus Genomes (1971), *Bacteriological reviews*, v.35 n.3, p. 235–241.
- Bandeira, L. M., Uehara, S. N., Asato, M. A., Aguenta, G. S., Maedo, C. M., Benites, N. H., e Tanaka, T. S. (2015). High prevalence of HTLV-1 infection among Japanese immigrants in non-endemic area of Brazil. *PLoS neglected tropical diseases*, 9, e0003691.
- Bangham, C. R. (2003). The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *Journal of General Virology*, 84, 3177-3189.
- Bangham, C. R., Araujo, A., Yamano, Y., e Taylor, G. P. (2015). HTLV-1-Associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15012.
- Barmak, K., Harhaj, E., Grant, C., Alefantis, T., e Wigdahl, B. (2003). Human T cell leukemia virus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology*, 308, 1-12.
- Besler, H. T., e Çomog˘lu, S. (2003). Lipoprotein oxidation, plasma total antioxidant capacity and homocysteine level in patients with multiple sclerosis. *Nutritional neuroscience*, 6, 189-196.
- Birben E, Murat U, Md S, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO J.* (2012). 5, 9–19.
- Blauth, K., Soltys, J., Matschulat, A., Reiter, C. R., Ritchie, A., Baird, N. L., e Owens, G. P. (2015). Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid cause demyelination of spinal cord explants. *Acta neuropathologica*, 130, 765-781
- Brosnan, C. F., Selmaj, K., e Raine, C. S. (1988). Hypothesis: a role for tumor necrosis factor in immune-mediated demyelination and its relevance to multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 18, 87-94.
- Burkitt, H. G., Young, B., Heath, J. W., Wheater, P. R., e Deakin, P. J. (2000). *Wheater's functional histology: a text and colour atlas*. Churchill Livingstone.
- Cann, J. A., *Principles of Molecular Virology.*, eds. 6. ed. (2016), pp. 4.
- Carneiro-Proiett et al., (2002). Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Nature*. 24, 6058–6068.



- Carpentier, A., Barez, P. Y., Hamaidia, M., Gazon, H., De Brogniez, A., Perike, S., e Willems, L. (2015). Modes of human T cell leukemia virus type 1 transmission, replication and persistence. *Viruses*, 7, 3603-3624.
- Carter, John., Saunders, Venetia. (2007). *Virology Principles and Applications.*, eds. 1. ed. (England: John Wiley e Sons), pp. 186.
- Carter, M., e Shieh, J. (2015). *Cell Culture Techniques. Guide to Research Techniques in Neuroscience*, 295–310.
- Catalan-Soares, B., Carneiro-Proietti, A. B. D. F., e Proietti, F. A. (2005). Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, 21, 926-931.
- Champs, A. P. S., de Azeredo Passos, V. M., Carvalho, G., Barreto, S. M., Meirelles, C., e Caramelli, P. (2019). Cognitive impairment in HTLV-1-associated myelopathy, proviral load and inflammatory markers. *International Journal of Infectious Diseases*, 84, 121-126.
- Chao, C. C., Hu, S., Sheng, W. S., Bu, D., Bukrinsky, M. I., e Peterson, P. K. (1996). Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. *Glia*, 16, 276-284.
- Cho, I., Sugimoto, M., Mita, S., Tokunaga, M., Imamura, F., e Ando, M. (1995). In vivo proviral burden and viral RNA expression in T cell subsets of patients with human T lymphotropic virus type-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 53, 412-418.
- Cho, S., Wood, A., e Bowlby, M. R. (2007). Brain slices as models for neurodegenerative disease and screening platforms to identify novel therapeutics. *Current neuropharmacology*, 5, 19-33.
- Coffin, J. M. (2015). The discovery of HTLV-1, the first pathogenic human retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, 15525-15529.
- Daneman, R. (2012). The blood–brain barrier in health and disease. *Annals of neurology*, 72, 648-672.
- Daneman, R., e Prat, A. (2015). The blood–brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7, a020412.
- Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., e Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature immunology*, 14, 986.
- Davson, H. U. G. H. (1976). Review lecture. The blood-brain barrier. *The Journal of physiology*, 255, 1-28.
- Dik, M. G., Jonker, C., Hack, C. E., Smit, J. H., Comijs, H. C., e Eikelenboom, P. (2005). Serum inflammatory proteins and cognitive decline in older persons. *Neurology*, 64, 1371-1377.
- Dik, M. G., Jonker, C., Hack, C. E., Smit, J. H., Comijs, H. C., e Eikelenboom, P. (2005). Serum inflammatory proteins and cognitive decline in older persons. *Neurology*, 64, 1371-1377.
- Doster, R. S., Rogers, L. M., Gaddy, J. A., e Aronoff, D. M. (2018). Macrophage extracellular traps: a scoping review. *Journal of innate immunity*, 10, 3-13.
- Dourado, I., Alcantara, L. C., Barreto, M. L., da Gloria Teixeira, M., e Galvao-Castro, B. (2003). HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 34, 527-531.
- Dursun, E., Gezen-Ak, D., Hanağası, H., Bilgiç, B., Lohmann, E., Ertan, S., e Gündüz, A. (2015). The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2-macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease. *Journal of neuroimmunology*, 283, 50-57.
- Echevarria-Lima, J., de Abreu Pereira, D., De Oliveira, T. S., de Melo Espíndola, O., Lima, M. A., Leite, A. C. C., e Zingali, R. B. (2018). Protein profile of blood monocytes is altered in HTLV-1 infected patients: Implications for HAM/TSP disease. *Scientific reports*, 8.
- Edwards, D., Fenizia, C., Gold, H., Castro-Amarante, M. F. D., Buchmann, C., Pise-Masison, C. A., e Franchini, G. (2011). Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. *Viruses*, 3, 861-885.

- Elhabazi, A., Marie-Cardine, A., Chabbert-de Ponnat, I., Bensussan, A., e Boumsell, L. (2003). Structure and function of the immune semaphorin CD100/SEMA4D. *Critical Reviews™ in Immunology*, 23.
- Engelhardt, B., e Ransohoff, R. M. (2012). Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood–brain barriers. *Trends in immunology*, 33, 579-589.
- Enose-Akahata, Y., Matsuura, E., Tanaka, Y., Oh, U., e Jacobson, S. (2012). Minocycline modulates antigen-specific CTL activity through inactivation of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I associated neurologic disease. *Retrovirology*, 9, 16.
- Enose-Akahata, Y., Matsuura, E., Tanaka, Y., Oh, U., e Jacobson, S. (2012). Minocycline modulates antigen-specific CTL activity through inactivation of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I associated neurologic disease. *Retrovirology*, 9, 16.
- Ercoli, L., Sarmati, L., Parisi, S. G., Mancino, G., Santis, G. D., Bonanno, E., e Andreoni, M. (1996). Human immunodeficiency virus infection of human bone marrow stromal myoid cells. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 28, 335-340.
- Facchinetti, L. D., Araújo, A. Q., Chequer, G. L., De Azevedo, M. F., De Oliveira, R. V. C., e Lima, M. A. (2013). Falls in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Spinal Cord*, 51, 222.
- Fan, N., Gavalchin, J., Paul, B., Wells, K. H., Lane, M. J., e Poiesz, B. J. (1992). Infection of peripheral blood mononuclear cells and cell lines by cell-free human T-cell lymphoma/leukemia virus type I. *Journal of clinical microbiology*, 30, 905-910.
- Franchini, G. (1995). Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood*, 86, 3619-3639.
- Franchini, G., Fukumoto, R., e Fullen, J. R. (2003). T-cell control by human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1. *International journal of hematology*, 78, 280-296.
- Franzoi, A. C., e Araújo, A. Q. C. (2005). Disability profile of patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis using the functional independence measure (FIM™). *Spinal cord*, 43, 236.
- Furuta, R., Yasunaga, J. I., Miura, M., Sugata, K., Saito, A., Akari, H., e Higuchi, Y. (2017). Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. *PLoS pathogens*, 13, e1006722.
- Fuzii, H. T., da Silva Dias, G. A., de Barros, R. J. S., Falcão, L. F. M., e Quaresma, J. A. S. (2014). Immunopathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Life sciences*, 104, 9-14.
- Gallo, R. C. (2005). The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*, 2, 17.
- Genis, P., Jett, M., Bernton, E. W., Boyle, T., Gelbard, H. A., Dzenko, K., e Volsky, D. J. (1992). Cytokines and arachidonic metabolites produced during human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophage-astroglia interactions: implications for the neuropathogenesis of HIV disease. *Journal of Experimental Medicine*, 176, 1703-1718.
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, et al. (1985). Antibodies to human T lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*, 2, 407-410.
- Gessain, A., e Cassar, O. (2012). Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Frontiers in microbiology*, 3, 388.
- Ghez, D., Lepelletier, Y., Lambert, S., Fourneau, J. M., Blot, V., Janvier, S., e Hermine, O. (2006). Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *Journal of virology*, 80, 6844-6854.
- Gillet, N. A., Malani, N., Melamed, A., Gormley, N., Carter, R., Bentley, D., e Bangham, C. R. (2011). The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1–infected T-cell clones. *Blood*, 117, 3113-3122.

- Giraudon, P., Vernant, J. C., Confavreux, C., Belin, M. F., e Desgranges, C. (1998). Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B) in cerebrospinal fluid of HTLV-1 infected patients with tropical spastic paraparesis. *Neurology*, 50, 1920-1920.
- Glabiński, A., Tawsek, N. S., e Bartosz, G. (1993). Increased generation of superoxide radicals in the blood of MS patients. *Acta neurologica scandinavica*, 88, 174-177.
- Gonçalves, D. U., Proietti, F. A., Ribas, J. G. R., Araújo, M. G., Pinheiro, S. R., Guedes, A. C., e Carneiro-Proietti, A. B. F. (2010). Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clinical microbiology reviews*, 23, 577-589.
- Gordon, S., e Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, 5, 953.
- Grant, C., Barmak, K., Alefantis, T., Yao, J., Jacobson, S., e Wigdahl, B. (2002). Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *Journal of cellular physiology*, 190, 133-159.
- Grant, C., Barmak, K., Alefantis, T., Yao, J., Jacobson, S., e Wigdahl, B. (2002). Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *Journal of cellular physiology*, 190, 133-159.
- Grassi, M. F. R., dos Santos, N. P., Lírio, M., Kritski, A. L., Almeida, M. D. C. C., Santana, L. P., e Galvão-Castro, B. (2016). Tuberculosis incidence in a cohort of individuals infected with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) in Salvador, Brazil. *BMC infectious diseases*, 16, 491.
- Hatakeyama, J., e Kageyama, R. (2002). Retrovirus-mediated gene transfer to retinal explants. *Methods*, 28, 387-395.
- Hermanns, K., Göhner, C., Kopp, A., Schmidt, A., Merz, W. M., Markert, U. R., e Drosten, C. (2018). Zika virus infection in human placental tissue explants is enhanced in the presence of dengue virus antibodies in-vitro. *Emerging microbes & infections*, 7, 1-8.
- Higashi, T., Tsukada, J., Yoshida, Y., Mizobe, T., Mouri, F., Minami, Y., e Tanaka, Y. (2005). Constitutive tyrosine and serine phosphorylation of STAT4 in T-cells transformed with HTLV-I. *Genes to Cells*, 10, 1153-1162.
- Higuchi, M., Nagasawa, K., Horiuchi, T., Oike, M., Ito, Y., Yasukawa, M., e Niho, Y. (1997). Membrane tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) expressed on HTLV-I-infected T cells mediates a costimulatory signal for B cell activation—characterization of membrane TNF- $\alpha$ . *Clinical immunology and immunopathology*, 82, 133-140.
- Hiscott, J., Nguyen, T. A., Arguello, M., Nakhaei, P., e Paz, S. (2006). Manipulation of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway and the innate immune response by viruses. *Oncogene*, 25, 6844.
- Hishizawa, M., Imada, K., Ishikawa, T., e Uchiyama, T. (2004). Kinetics of proviral DNA load, soluble interleukin-2 receptor level and tax expression in patients with adult T-cell leukemia receiving allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*, 18, 167.
- Hlela, C., Shepperd, S., Khumalo, N. P., e Taylor, G. P. (2009). The prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 in the general population is unknown. *Aids Rev*, 11, 205-214.
- Hoffman, P. M., Dhib-Jalbut, S., Mikovits, J. A., Robbins, D. S., Wolf, A. L., Bergey, G. K., e Ruscetti, F. W. (1992). Human T-cell leukemia virus type I infection of monocytes and microglial cells in primary human cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 11784-11788.
- Hofmann, N., Lachnit, N., Streppel, M., Witter, B., Neiss, W. F., Guntinas-Lichius, O., e Angelov, D. N. (2002). Increased expression of ICAM-1, VCAM-1, MCP-1, and MIP-1 $\alpha$  by spinal perivascular macrophages during experimental allergic encephalomyelitis in rats. *BMC immunology*, 3, 11.
- Holmström, K. M., e Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15, 411-421.
- Hoshino, H. (2012). Cellular factors involved in HTLV-1 entry and pathogenicity. *Frontiers in microbiology*, 3, 222.

- Huang, W., Eum, S. Y., András, I. E., Hennig, B., e Toborek, M. (2009). PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  attenuate HIV-induced dysregulation of tight junction proteins by modulations of matrix metalloproteinase and proteasome activities. *The FASEB Journal*, 23, 1596-1606.
- Huitinga, I., Van Rooijen, N., De Groot, C. J., Uitdehaag, B. M., e Dijkstra, C. D. (1990). Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. *Journal of Experimental Medicine*, 172, 1025-1033.
- Hume, D. A., Robinson, A. P., MacPherson, G. G., e Gordon, S. I. A. M. O. N. (1983). The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs. *Journal of Experimental Medicine*, 158, 1522-1536.
- Hunter, M. I. S., Nlemadim, B. C., e Davidson, D. L. W. (1985). Lipid peroxidation products and antioxidant proteins in plasma and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Neurochemical research*, 10, 1645-1652.
- Igakura, T., Stinchcombe, J. C., Goon, P. K., Taylor, G. P., Weber, J. N., Griffiths, G. M., e Bangham, C. R. (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science*, 299, 1713-1716.
- Inoue, J., Yoshida, M., e Seiki, M. (1987). Transcriptional (p40x) and post-transcriptional (p27x-III) regulators are required for the expression and replication of human T-cell leukemia virus type I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 3653-3657.
- Iwasaki, Y., Ohara, Y., Kobayashi, I., e Akizuki, S. (1992). Infiltration of helper/inducer T lymphocytes heralds central nervous system damage in human T-cell leukemia virus infection. *The American journal of pathology*, 140, 1003.
- Izumo, S., Ijichi, T., Higuchi, I., Tashiro, A., Takahashi, K., e Osame, M. (1992). Neuropathology of HTLV-I-Associated Myelopathy—A Report of Two Autopsy Cases—. *Pediatrics International*, 34, 358-364.
- Jacobson, S., Krichavsky, M., Flerlage, N., e Levin, M. (1997). Immunopathogenesis of HTLV-I associated neurologic disease: massive latent HTLV-I infection in bone marrow of HAM/TSP patients. *Leukemia*, 11.
- Jana, M., Anderson, J. A., Saha, R. N., Liu, X., e Pahan, K. (2005). Regulation of inducible nitric oxide synthase in proinflammatory cytokine-stimulated human primary astrocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, 38, 655-664.
- Jones, K. S., Lambert, S., Bouttier, M., Bénit, L., Ruscetti, F. W., Hermine, O., e Pique, C. (2011). Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses*, 3, 794-810.
- Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D. C., Huang, Y., e Ruscetti, F. W. (2005). Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *Journal of virology*, 79, 12692-12702.
- Journo, C., e Mahieux, R. (2011). HTLV-1 and innate immunity. *Viruses*, 3, 1374-1394.
- Kadl, A., Meher, A. K., Sharma, P. R., Lee, M. Y., Doran, A. C., Johnstone, S. R., e Kensler, T. (2010). Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circulation research*, 107, 737-746.
- Kamiichi, A., Furihata, T., Kishida, S., Ohta, Y., Saito, K., Kawamatsu, S., e Chiba, K. (2012). Establishment of a new conditionally immortalized cell line from human brain microvascular endothelial cells: a promising tool for human blood-brain barrier studies. *Brain research*, 1488, 113-122.
- Kashima, S., Alcantara, L. C., Takayanagui, O. M., Cunha, M. A. V., Castro, B. G., Pombo-de-Oliveira, M. S., ... e Covas, D. T. (2006). Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region. *AIDS Research & Human Retroviruses*, 22, 953-959.
- Kim, F. J., Manel, N., Boublik, Y., Battini, J. L., e Sitbon, M. (2003). Human T-cell leukemia virus type 1 envelope-mediated syncytium formation can be activated in resistant mammalian cell lines by a carboxy-terminal truncation of the envelope cytoplasmic domain. *Journal of virology*, 77, 963-969.

- Klingbeil, M. F. G., Herson, M. R., Cristo, E. B., dos Santos Pinto, D., Yoshito, D., e Mathor, M. B. (2009). Comparison of two cellular harvesting methods for primary human oral culture of keratinocytes. *Cell and tissue banking*, 10, 197-204.
- Kohchi, C., Inagawa, H., Nishizawa, T., e Soma, G. I. (2009). ROS and innate immunity. *Anticancer research*, 29, 817-821.
- Koralnik, I. J., J. Fullen, and G. Franchini. (1993). The p12I, p13II, and p30II proteins encoded by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type-1 open reading frames I and II are localized in three different cellular compartments. *J. Virol*, 67, 2360-2366.
- Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J. I., Iwamasa, T., e Yamamoto, N. (1993). In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*, 196, 25-33.
- Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J. I., Iwamasa, T., e Yamamoto, N. (1993). In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*, 196, 25-33.
- Kozora, E., Laudenslager, M., Lemieux, A., e West, S. G. (2001). Inflammatory and hormonal measures predict neuropsychological functioning in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 7, 745-754.
- Kozora, E., Laudenslager, M., Lemieux, A., e West, S. G. (2001). Inflammatory and hormonal measures predict neuropsychological functioning in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 7, 745-754.
- Kubota, R., Nagai, M., Kawanishi, T., Osame, M., e Jacobson, S. (2000). Increased HTLV type 1 tax specific CD8+ cells in HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV type 1 proviral load. *AIDS research and human retroviruses*, 16, 1705-1709.
- Kuroda, Y., e Matsui, M. (1993). Cerebrospinal fluid interferon-gamma is increased in HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of neuroimmunology*, 42, 223-226.
- Lambert, S., Bouttier, M., Vassy, R., Seigneuret, M., Petrow-Sadowski, C., Janvier, S., e Pique, C. (2009). HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood*, 113, 5176-5185.
- Leite, A. C., Silva, M. T. T., Alamy, A. H., Afonso, C. R., Lima, M. A., Andrada-Serpa, M. J., e Araújo, A. Q. C. (2004). Peripheral neuropathy in HTLV-I infected individuals without tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of neurology*, 251, 877-881.
- Lepoutre, V., Jain, P., Quann, K., Wigdahl, B., e Khan, Z. K. (2009). Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 14, 1152.
- Lima, M. A., Harab, R. C., Schor, D., Andrada-Serpa, M. J., e Araújo, A. Q. (2007). Subacute progression of human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Journal of neurovirology*, 13, 468-473.
- Lu, F., Selak, M., O'Connor, J., Croul, S., Lorenzana, C., Butunoi, C., e Kalman, B. (2000). Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 177, 95-103.
- M Larsen, J., R Martin, D., e E Byrne, M. (2014). Recent advances in delivery through the blood-brain barrier. *Current topics in medicinal chemistry*, 14, 1148-1160.
- MacMicking, J. D., Willenborg, D. O., Weidemann, M. J., Rockett, K. A., e Cowden, W. B. (1992). Elevated secretion of reactive nitrogen and oxygen intermediates by inflammatory leukocytes in hyperacute experimental autoimmune encephalomyelitis: enhancement by the soluble products of encephalitogenic T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 176, 303-307.
- Maldonado, H., Ramírez, E., Utreras, E., Pando, M. E., Kettlun, A. M., Chiong, M., e Valenzuela, M. A. (2011). Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 but not of glycogen synthase kinase 3- $\beta$  prevents neurite retraction and tau hyperphosphorylation caused by secretable products of human T-cell leukemia virus type I-infected lymphocytes. *Journal of neuroscience research*, 89, 1489-1498.
- Mantovani, A., e Locati, M. (2009). Orchestration of macrophage polarization. *Blood*, 114, 3135-3136.

- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., e Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, 25, 677-686.
- Martin, J., Maldonado, J., Mueller, J., Zhang, W., e Mansky, L. (2016). Molecular studies of HTLV-1 replication: An update. *Viruses*, 8, 31.
- Martinez, M. P., Al-Saleem, J., e Green, P. L. (2019). Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*, 16, 1-12.
- Martins, J. V. P., Baptista, A. F., e Araújo, A. D. Q. C. (2012). Quality of life in patients with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Arquivos de Neuro-psiquiatria*, 70, 257-261.
- Matsuoka, M., e Jeang, K. T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature Reviews Cancer*, 7, 270.
- Matsuura, E., Yamano, Y., e Jacobson, S. (2010). Neuroimmunity of HTLV-I infection. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 5, 310-325.
- McAfoose, J., Koerner, H., e Baune, B. T. (2009). The effects of TNF deficiency on age-related cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 615-619.
- McAfoose, J., Koerner, H., e Baune, B. T. (2009). The effects of TNF deficiency on age-related cognitive performance. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 615-619.
- Mello, M. A. G., da Conceição, A. F., Sousa, S. M. B., Alcântara, L. C., Marin, L. J., da Silva Raiol, M. R., e Bastos, R. G. (2014). HTLV-1 in pregnant women from the Southern Bahia, Brazil: a neglected condition despite the high prevalence. *Virology journal*, 11, 28.
- Meylan, E., Tschopp, J. e Karin, M. (2006). Receptores de reconhecimento de padrões intracelulares na resposta do hospedeiro. *Nature*, 442, 39.
- Miller, F., Afonso, P. V., Gessain, A., e Ceccaldi, P. E. (2012). Blood-brain barrier and retroviral infections. *Virulence*, 3, 222-229.
- Minagar, A., Shapshak, P., Fujimura, R., Ownby, R., Heyes, M., e Eisdorfer, C. (2002). The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 202, 13-23.
- Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Shiraishi Y. (1981). Linha de células T derivada de leucócitos de cordão humano normal por co-cultura com células T leucêmicas humanas, *Gan* 72, 978-981.
- Miyoshi, I., Kubonishi, I., Yoshimoto, S., Akagi, T., Ohtsuki, Y., Shiraishi, Y., e Hinuma, Y. (1981). Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature*, 294, 770-771.
- Miyoshi, I., Kubonishi, I., Yoshimoto, S., e Shiraishi, Y. (1981). A T-cell line derived from normal human cord leukocytes by co-culturing with human leukemic T-cells. *Gann= Gan*, 72, 978-981.
- Mochizuki, M., Watanabe, T., Yamaguchi, K., Takatsuki, K., Yoshimura, K., Shirao, M., e Miyata, N. (1992). HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. *Japanese Journal of Cancer Research*, 83, 236-239.
- Moghadam, M. H., Rezaee, S. R., Hosseini, M., Niazmand, S., Salmani, H., Rafatpanah, H., e Mahmoudabady, M. (2018). HTLV-1 infection-induced motor dysfunction, memory impairment, depression, and brain tissues oxidative damage in female BALB/c mice. *Life sciences*, 212, 9-19.
- Monteiro, D. L. M., Taquette, S. R., Barmpas, D. B. S., Rodrigues, N. C. P., Teixeira, S. A., Villela, L. H. C., e Trajano, A. J. B. (2014). Prevalence of HTLV-1/2 in pregnant women living in the metropolitan area of Rio de Janeiro. *PLoS neglected tropical diseases*, 8, e3146.
- Morgan, O. S., Mora, C., Rodgers-Johnson, P., e Char, G. (1989). HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *The Lancet*, 334, 1184-1187.
- Mühlisen, A., Giaisi, M., Köhler, R., Krammer, P. H., e Li-Weber, M. (2014). Tax contributes apoptosis resistance to HTLV-1-infected T cells via suppression of Bid and Bim expression. *Cell death & disease*, 5, e1575.

- Murray, P. J., e Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews immunology*, 11, 723.
- Nagai, M., Usuku, K., Matsumoto, W., Kodama, D., Takenouchi, N., Moritoyo, T., e Osame, M. (1998). Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *Journal of neurovirology*, 4, 586-593.
- Naidoo, R., e Knapp, M. L. (1992). Studies of lipid peroxidation products in cerebrospinal fluid and serum in multiple sclerosis and other conditions. *Clinical chemistry*, 38, 2449-2454.
- Nakamura, S., Nagano, I., Yoshioka, M., Shimazaki, S., Onodera, J., e Kogure, K. (1993). Detection of tumor necrosis factor- $\alpha$ -positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of neuroimmunology*, 42, 127-130.
- Nascimento, C. R., Lima, M. A., de Andrada Serpa, M. J., Espindola, O., Leite, A. C. C., e Echevarria-Lima, J. (2011). Monocytes from HTLV-1-infected patients are unable to fully mature into dendritic cells. *Blood*, 117, 489-499.
- Nathan, C. F., Murray, H. W., Wiebe, M. E., e Rubin, B. Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *Journal of Experimental Medicine*, 158, 670-689.
- Nejmeddine, M., Barnard, A. L., Tanaka, Y., Taylor, G. P., e Bangham, C. R. (2005). Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 29653-29660.
- Netto, E. C., e Brites, C. (2011). Characteristics of chronic pain and its impact on quality of life of patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *The Clinical journal of pain*, 27, 131-135.
- Nicolás, D., Ambrosioni, J., Paredes, R., Marcos, M. Á., Manzardo, C., Moreno, A., e Miró, J. M. (2015). Infection with human retroviruses other than HIV-1: HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 and HTLV-4. *Expert review of anti-infective therapy*, 13, 947-963.
- Nishioka, K., Maruyama, I., Sato, K., Kitajima, I., Nakajima, Y., e Osame, M. (1989). Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. *The Lancet*, 333, 441.
- Nishiura, Y., Nakamura, T., Ichinose, K., Shirabe, S., Tsujino, A., Goto, H., e Nagataki, S. (1996). Increased production of inflammatory cytokines in cultured CD4+ cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 179, 227-233.
- Nkyimbeng-Takwi, E., e Chapoval, S. P. (2011). Biology and function of neuroimmune semaphorins 4A and 4D. *Immunologic research*, 50, 10-21.
- Nomura, H., Umekita, K., Hashikura, Y., Umeki, K., Yamamoto, I., Aratake, Y., e Okayama, A. (2019). Diversity of cell phenotypes among MT-2 cell lines affects the growth of U937 cells and cytokine production. *Human cell*, 32, 185-192.
- Nomura, H., Umekita, K., Hashikura, Y., Umeki, K., Yamamoto, I., Aratake, Y., e Okayama, A. (2019). Diversity of cell phenotypes among MT-2 cell lines affects the growth of U937 cells and cytokine production. *Human cell*, 32, 185-192.
- Nottet, H. S. (2005). *The Neurology of AIDS*.
- Ohri, C. M., Shikotra, A., Green, R. H., Waller, D. A., e Bradding, P. (2009). Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *European Respiratory Journal*, 33, 118-126.
- Olière, S., Douville, R., Sze, A., Belgnaoui, S. M., e Hiscott, J. (2011). Modulation of innate immune responses during human T-cell leukemia virus (HTLV-1) pathogenesis. *Cytokine e growth factor reviews*, 22, 197-210.
- Osame, M. (2002). Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *Journal of neurovirology*, 8, 359-364.

- Padgett, L. E., Burg, A. R., Lei, W., e Hubert, M. T. (2015). Loss of NADPH oxidase-derived superoxide skews macrophage phenotypes to delay type 1 diabetes. *Diabetes*, 64, 937-946.
- Pawate, S., Shen, Q., Fan, F., e Bhat, N. R. (2004). Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferony. *Journal of neuroscience research*, 77, 540-551.
- Percher, F., Jeannin, P., Martin-Latil, S., Gessain, A., Afonso, P., Vidy-Roche, A., e Ceccaldi, P. E. (2016). Mother-to-child transmission of HTLV-1 epidemiological aspects, mechanisms and determinants of mother-to-child transmission. *Viruses*, 8, 40.
- Pique, C., e Jones, K. S. (2012). Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Frontiers in microbiology*, 3, 378.
- Ploeger, D. T., Hosper, N. A., Schipper, M., Koerts, J. A., de Rond, S., e Bank, R. A. (2013). Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts. *Cell Communication and Signaling*, 11, 29.
- Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., e Gallo, R. C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77, 7415-7419.
- Prince, H. E., York, J., Golding, J., Owen, S. M., e Lal, R. B. (1994). Spontaneous lymphocyte proliferation in human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infection: T-cell subset responses and their relationships to the presence of provirus and viral antigen production. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 1, 273-282.
- Richardson, J. H., Edwards, A. J., Cruickshank, J. K., Rudge, P., e Dalgleish, A. G. (1990). In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *Journal of virology*, 64, 5682-5687.
- Richardson, J. H., Edwards, A. J., Cruickshank, J. K., Rudge, P., e Dalgleish, A. G. (1990). In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *Journal of virology*, 64, 5682-5687.
- Romero, I. A., Prevost, M. C., Perret, E., Adamson, P., Greenwood, J., Couraud, P. O., e Ozden, S. (2000). Interactions between brain endothelial cells and human T-cell leukemia virus type 1-infected lymphocytes: mechanisms of viral entry into the central nervous system. *Journal of virology*, 74, 6021-6030.
- Saha, R. N., e Pahan, K. (2003). Tumor necrosis factor- $\alpha$  at the crossroads of neuronal life and death during HIV-associated dementia. *Journal of neurochemistry*, 86, 1057-1071.
- Saito, M. (2010). Immunogenetics and the pathological mechanisms of human T-cell leukemia virus type 1-(HTLV-1-) associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2010.
- Santos, N. S., Romanos, M. T., e Wigg, M. D. (2015). Estratégias de replicação do vírus. In: *Virologia Humana*. eds. 3. ed. (Rio de Janeiro: Guanabara Koogan), pp. 34-35.
- Santos, N. S., Romanos, M. T., e Wigg, M. D. (2015). Virose oncológicas. In: *Virologia Humana*. eds. 3. ed. (Rio de Janeiro: Guanabara Koogan), pp. 535.
- Schieber, M., e Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, 24, R453-R462.
- Schweitzer, K. M., Vicart, P., Delouis, C., Paulin, D., Dräger, A. M., Langenhuijsen, M. M., e Weksler, B. B. (1997). Characterization of a newly established human bone marrow endothelial cell line: distinct adhesive properties for hematopoietic progenitors compared with human umbilical vein endothelial cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 76, 25-36.
- Seiki, M., Hattori, S., Hirayama, Y., e Yoshida, M. (1983). Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proceedings of the national academy of sciences*, 80, 3618-3622.
- Selmaj, K. W., e Raine, C. S. (1988). Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Annals of neurology*, 23, 339-346.
- Shakudo, M., Inoue, Y., e Tsutada, T. (1999). HTLV-I-associated myelopathy: acute progression and atypical MR findings. *American journal of neuroradiology*, 20, 1417-1421.



- Silva, M. T. T., Mattos, P., Alfano, A., e Araújo, A. Q. (2003). Neuropsychological assessment in HTLV-1 infection: a comparative study among TSP/HAM, asymptomatic carriers, and healthy controls. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 74, 1085-1089.
- Spanemberg, L., Caldieraro, M. A., Vares, E. A., Wollenhaupt-Aguiar, B., Kauer-Sant'Anna, M., Kawamoto, S. Y., e Fleck, M. P. (2014). Biological differences between melancholic and nonmelancholic depression subtyped by the CORE measure. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 10, 1523.
- Starling, A. L. B., Martins-Filho, O. A., Lambertucci, J. R., Labanca, L., de Souza Pereira, S. R., Teixeira-Carvalho, A., e Gonçalves, D. U. (2013). Proviral load and the balance of serum cytokines in HTLV-1-asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Acta tropica*, 125, 75-81.
- Takahashi, M., Higuchi, M., Makokha, G. N., Matsuki, H., Yoshita, M., Tanaka, Y., e Fujii, M. (2013). HTLV-1 Tax oncoprotein stimulates ROS production and apoptosis in T cells by interacting with USP10. *Blood*, 122, 715-725.
- Takamatsu, H., e Kumanogoh, A. (2012). Diverse roles for semaphorin-plexin signaling in the immune system. *Trends in immunology*, 33, 127-135.
- Takeuchi, H., Takahashi, M., Norose, Y., Takeshita, T., Fukunaga, Y., e Takahashi, H. (2010). Transformation of breast milk macrophages by HTLV-I: implications for HTLV-I transmission via breastfeeding. *Biomedical research*, 31, 53-61.
- Takeuchi, H., Takahashi, M., Norose, Y., Takeshita, T., Fukunaga, Y., e Takahashi, H. (2010). Transformation of breast milk macrophages by HTLV-I: implications for HTLV-I transmission via breastfeeding. *Biomedical research*, 31, 53-61.
- Tangy, F. (1996) *Molecular Biology of HTLV-1. HTLV-1, truths and questions*. Colombia, Cali, Feriva Editores, 1-13.
- Taylor, G. P. (1998). Pathogenesis and treatment of HTLV-I associated myelopathy. *Sexually transmitted infections*, 74, 316.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., e Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer*, 26, 171-176.
- Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. (1977). Adult T-cell leukemia: Clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*, 50, 481-492.
- Uchiyama, T. (1997). Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. *Annual review of immunology*, 15, 15-37.
- Valeri, V. W., Hryniewicz, A., Andresen, V., Jones, K., Fenizia, C., Bialuk, I., e Nicot, C. (2010). Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. *Blood*, 116, 3809-3817.
- Van Dooren, S., Gotuzzo, E., Salemi, M., Watts, D., Audenaert, E., Duwe, S., e Vandamme, A. M. (1998). Evidence for a post-Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus [type I][corrected] in Latin America. *Journal of General Virology*, 79, 2695-2708.
- Van Ginderachter, J. A., Movahedi, K., Ghassabeh, G. H., Meerschaut, S., Beschin, A., Raes, G., e De Baetselier, P. (2006). Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology*, 211, 487-501.
- Vandamme, A. M., Salemi, M., Van Brussel, M., Liu, H. F., Van Laethem, K., Van Ranst, M., e Goubau, P. (1998). African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-2d subtype in Congolese Bambuti Efe Pygmies. *Journal of virology*, 72, 4327-4340.
- Vladimirova, O., Lu, F. M., Shawver, L., e Kalman, B. (1999). The activation of protein kinase C induces higher production of reactive oxygen species by mononuclear cells in patients with multiple sclerosis than in controls. *Inflammation research*, 48, 412-416.

- Vogel, D. Y., Glim, J. E., Stavenuiter, A. W., Breur, M., Heijnen, P., Amor, S., e Beelen, R. H. (2014). Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared. *Immunobiology*, 219, 695-703.
- Vrieling, H., e Reesink, H. W. (2004). HTLV-I/II prevalence in different geographic locations. *Transfusion medicine reviews*, 18, 46-57.
- Vunjak-Novakovic, G., e Freshney, R. I. (Eds.). (2006). *Culture of cells for tissue engineering* (Vol. 7). New York: Wiley-Liss.
- Watanabe, T. (1997). HTLV-1-Associated diseases. *International journal of hematology*, 66, 257-278.
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., e Couraud, P. O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1788, 842-857.
- Wiesendanger M. Constantin von Monakow (1853–1930) and Lina Stern (1878–1968). (2010). early explorations of the plexus choroideus and the blood-brain-barrier. *Schweizer Archiv für Neurologie und Psychiatrie*, 161, 140-4.
- Williams, K. C., Corey, S., Westmoreland, S. V., Pauley, D., Knight, H., Debakker, C., e Lackner, A. A. (2001). Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *Journal of Experimental Medicine*, 193, 905-916.
- Wolfe, N. D., Heneine, W., Carr, J. K., Garcia, A. D., Shanmugam, V., Tamoufe, U., e McCutchan, F. E. (2005). Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 7994-7999.
- Wynn, T. A., Chawla, A., e Pollard, J. W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 496, 445.
- Yamamoto, N., Matsumoto, T., Koyanagi, Y., Tanaka, Y., e Hinuma, Y. (1982). Unique cell lines harbouring both Epstein-Barr virus and adult T-cell leukaemia virus, established from leukaemia patients. *Nature*, 299, 367-369.
- Yamamoto, N., Okada, M., Koyanagi, Y., Kannagi, M., e Hinuma, Y. (1982). Transformation of human leukocytes by cocultivation with an adult T cell leukemia virus producer cell line. *Science*, 217, 737-739.
- Yamano, Y., e Sato, T. (2012). Clinical pathophysiology of human T-lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Frontiers in microbiology*, 3, 389.
- Yamano, Y., Sato, T., Coler-Reilly, A., Utsunomiya, A., Araya, N., Yagishita, N., Ando, H., e Nishioka, K. (2013). CSF CXCL10, CXCL9, and neopterin as candidate prognostic biomarkers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *PLoS neglected tropical diseases*, 7, e2479.
- Yamano, Y., Sato, T., Coler-Reilly, A., Utsunomiya, A., Araya, N., Yagishita, N., Ando, H., e Nishioka, K. (2013). CSF CXCL10, CXCL9, and neopterin as candidate prognostic biomarkers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *PLoS neglected tropical diseases*, 7, e2479.
- Zhang, X., Sun, H., Tang, X., Ji, J., Li, X., Sun, J., e Han, Z. C. (2005). Comparison of cell-suspension and explant culture of rabbit limbal epithelial cells. *Experimental eye research*, 80, 227-233.
- Zhang, Z., Zhang, Z. Y., Schittenhelm, J., Wu, Y., Meyermann, R., e Schluessener, H. J. (2011). Parenchymal accumulation of CD163+ macrophages/microglia in multiple sclerosis brains. *Journal of neuroimmunology*, 237, 73-79.
- Zhao, M. L., Kim, M. O., Morgello, S., e Lee, S. C. (2001). Expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 and caspase-1 in HIV-1 encephalitis. *Journal of neuroimmunology*, 115, 182-191.
- Zhao, M. L., Kim, M. O., Morgello, S., e Lee, S. C. (2001). Expression of inducible nitric oxide synthase, interleukin-1 and caspase-1 in HIV-1 encephalitis. *Journal of neuroimmunology*, 115, 182-191.
- Zhi, H., Yang, L., Kuo, Y. L., Ho, Y. K., Shih, H. M., e Giam, C. Z. (2011). NF- $\kappa$ B hyper-activation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS pathogens*, 7, e1002025.

Zlokovic, B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57, 178-201.