

JOÃO VICTOR CARVALHO DE DEUS

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ALARMINA
WARS EM LEUCÓCITOS DE PESSOAS
VIVENDO COM HTLV-1



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

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
AGOSTO / 2023

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

CIP - Catalogação na Publicação

C311a Carvalho de Deus, João Victor
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ALARMINA WARS EM
LEUCÓCITOS DE PESSOAS VIVENDO COM HTLV-1 / João
Victor Carvalho de Deus. -- Rio de Janeiro, 2023.
58 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, 2023.

1. HTLV-1. 2. MAH/PET. 3. WARS. 4. Alarmina. 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: João Victor Carvalho de Deus

DRE: 117090554

BANCA EXAMINADORA: Prof. Anderson Guimarães Baptista Costa (Presidente)
Prof. Fabiano Ferreira Dutra
Dr. Sharton Vinícius Antunes Coelho
Profª. Renata Meirelles Pereira (Suplente)

**Título da Monografia: “Avaliação da expressão da Alarmina Wars em linfócitos
de pessoas vivendo com HTLV-1”**

Local: Sala Vermelha / IMPG / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 02 de agosto de 2023 às 14:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,0 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, 02 de agosto de 2023.

NOTA

9,0

9,0

9,0

Banca Examinadora:

Anderson Guimarães

Prof. Anderson Guimarães Baptista Costa

Fabiano Ferreira Dutra

Prof. Fabiano Ferreira Dutra

Sharton Vinícius Antunes Coelho

Dr. Sharton Vinícius Antunes Coelho

Profª. Renata Meirelles Pereira

Aluno:

João Victor Carvalho de Deus

João Victor Carvalho de Deus

Orientador:

Juliana Echevarria Lima

Profª. Juliana Echevarria Lima

Coordenador
de TCC

Profª. Marinella Silva Laport

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ana Lúcia, Rossini, e meu padrasto, Valmir que com muito esforço se dedicaram para me proporcionar a melhor educação possível. O apoio que recebi foi fundamental para eu chegar aonde eu cheguei. Aos meus demais familiares, sempre deram maior apoio e incentivo.

Gostaria de agradecer ao meu irmão Rossini Tozeli, que desde que eu me conheço por gente tem sido um exemplo de homem e de honestidade frente aos desafios da vida, muito obrigado por todos os conselhos sobre a vida, por todo o apoio que você me deu desde que soube da minha vontade de trabalhar com ciência e pesquisa científica num país que não valoriza a ciência. Passamos por muitas situações juntos e você foi uma das pessoas que mais me ajudou durante esses anos.

Quero agradecer a Professora Juliana Echevarria, minha orientadora, pelo apoio e incentivo nesse momento mais importante da minha graduação. A professora Juliana tem uma atenção excepcional com cada aluno e é uma das professoras mais dedicada que já vi na academia, se propondo a fazer os experimentos na bancada para os alunos que ainda não tem segurança nos experimentos. Muito obrigado pelos conselhos, críticas, por ter me influenciado a crescer como cientista e pessoa e por ter sido uma ótima orientadora no final da graduação. Obrigado por todas as oportunidades, pela orientação, pela confiança e apoio, pelo suporte na elaboração de todos os meus textos e trabalhos e pelo conhecimento que você transmite no dia a dia do laboratório. Quero agradecer a todas as demais pessoas do Laboratório de Imunologia Básica e Aplicada pelo suporte e conselhos desde que entrei no laboratório.

Agradeço a Fernanda Alves que é uma amiga sensacional que a militância da Unidade Popular me deu e que hoje é uma das principais responsáveis por eu não ter desistido da vida acadêmica, sua dedicação com estudos e a pesquisa é um exemplo para mim, muito obrigado por todo o apoio que você me deu!

Agradeço a Anna Luiza por ser essa amiga incrível ao meu lado sobretudo neste último ano de graduação. Sem a sua amizade com certeza eu não teria confiança para continuar na faculdade, muito obrigado por me ouvir em momentos de desabafo. Apenas a sua presença ao meu lado em muitas ocasiões foi o suficiente para melhorar meus dias ruins e me fazer seguir em frente, construindo um mundo novo e lutando por uma sociedade antiespecista e sem opressões. Você foi um dos melhores presentes que a vida me deu e eu tenho muita sorte de ser teu amigo!

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, ao Instituto de Microbiologia, seu corpo docente e administrativo. Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, FAPERJ que sustentam e financiam a pesquisa brasileira.

*“Seja qual for o rumo que tomarmos,
nosso destino está indissoluvelmente
ligado à ciência.”*

(Carl Sagan)

RESUMO

JOÃO VICTOR CARVALHO DE DEUS

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ALARMINA WARS EM LEUCÓCITOS DE PESSOAS VIVENDO COM HTLV-1

Orientadora: Juliana Echevarria Lima

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

O vírus linfotrópico 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) e da leucemia/linfoma de células T do adulto. A MAH/PET é uma doença inflamatória crônica e neurodegenerativa caracterizada por danos no sistema nervoso central com perda da bainha de mielina, perda axonal e gliose. Essa doença inflamatória depende da infiltração de leucócitos ativados e/ou infectados para a medula espinhal, assim como a desregulação da barreira hematoencefálica. Estudos demonstraram que células T, células B, células dendríticas, macrófagos e monócitos são os tipos celulares infectados pelo HTLV-1. Durante processos inflamatórios alarminas são moléculas endógenas, também conhecidas como Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs), podem ser liberadas em função de mecanismos de estresse, lesão ou morte celular, podendo ser desencadeados pela presença de patógenos. A WARS tem função na catalisação da ligação do aminoácido triptofano ao seu tRNA (RNA transportador) cognato durante a tradução proteica, mas pode ser liberada como uma alarmina durante processos infecciosos. Estudos com a alarmina WARS mostram que esta proteína pode inibir a replicação *in vivo* e *in vitro* e é encontrada no soro em níveis aumentados de indivíduos infectados pelo vírus citomegalovírus humano (CMV) e o vírus da Hepatite B. Entretanto, pouco se sabe a respeito do envolvimento da alarmina WARS na resposta imune frente a infecção pelo HTLV-1 e durante o desencadeamento da MAH/PET. Assim, propomos a analisar a expressão da WARS em células MT2 (permanentemente infectadas pelo HTLV-1), assim como investigar os níveis da proteína nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ obtidas de indivíduos com HTLV-1, assintomáticos (AC) e portadores de MAH/PET. Os resultados indicam que a alarmina WARS é expressa e secretada nas células imortalizadas infectadas por HTLV-1. Os resultados também indicam que os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de indivíduos com HTLV-1 expressam a alarmina WARS. Entretanto, os níveis da proteína WARS em linfócitos T CD8 (naive, memória central e efetora) obtidos de indivíduos AC encontram-se reduzidos em comparação aos níveis encontrados nas células obtidas de indivíduos não infectados ou portadores da MAH/PET. Células mononucleares dos indivíduos vivendo com HTLV-1 foram capazes de secretar a alarmina WARS quando estimuladas com o peptídeo viral Tax do HTLV-1. Em conclusão, esses resultados indicam que a secreção da alarmina WARS pode ser modulada durante a infecção pelo HTLV-1.

Palavras-chave: HTLV-1, MAH/PET, WARS, Alarminas

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS

JOÃO VICTOR CARVALHO DE DEUS

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA ALARMINA WARS EM LEUCÓCITOS DE PESSOAS VIVENDO COM HTLV-1

Orientadora: Juliana Echevarria Lima

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

O vírus linfotrópico para a célula T humana do tipo 1, ou HTLV-1, é um vírus da mesma família do HIV (vírus da imunodeficiência humana causador da AIDS). O HTLV-1 também pode causar doenças, como a mielopatia, que é uma inflamação no sistema nervoso central e provoca danos nos nervos. Existem pessoas infectadas pelo HTLV-1 em todo mundo, principalmente, na África Central, Japão e América Central e do Sul, sendo o Brasil um dos países com o maior número de infectados. Esse vírus é transmitido pelo aleitamento materno, contato com sangue contaminado e por relação sexual desprotegida. Nos pacientes que desenvolvem a doença, o vírus acaba impactando diretamente no bem-estar, pois gradativamente as pessoas infectadas perdem a capacidade de andar e se tornam dependentes da família para realizar atividades comuns. Mas, há uma parcela de infectados que não desenvolvem a doença, ficando assintomáticos por muitos anos até desenvolver a doença. Durante uma infecção, nosso corpo libera certas substâncias que funcionam como alarmes, acionados após uma invasão de um microrganismo ou dano celular, e por isto são chamadas de alarminas. Elas agem como sinalizadores de perigo para as células do nosso corpo, para iniciar uma resposta de defesa. Uma dessas alarminas é a proteína WARS. Nosso estudo buscou entender se a alarmina WARS está envolvida na resposta imune contra o vírus HTLV-1. Os resultados indicam que a proteína WARS está presente nas células de pessoas infectadas pelo HTLV-1. Essas células de pessoas infectadas foram capazes de liberar a proteína WARS, assim ela poderá atuar como uma alarmina, ativando as células de defesa do corpo, ou seja, células do sistema imunitário. Mas ainda são necessárias mais pesquisas para entender melhor o papel da alarmina WARS na infecção pelo HTLV-1 e no desenvolvimento da mielopatia causada pelo vírus.

Palavras-chave: HTLV-1, mielopatia, Alarminas.

ABSTRACT

JOÃO VICTOR CARVALHO DE DEUS

EVALUATION OF ALARMIN WARS EXPRESSION IN LEUKOCYTES DERIVED FROM PEOPLE LIVING WITH 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.

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is the etiologic agent of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and adult T-cell leukemia/lymphoma. HAM/TSP is a chronic inflammatory and neurodegenerative disease, characterized by central nervous system damage with myelin sheath loss, axonal loss, and gliosis. This inflammatory disease depends on the infiltration of activated and/or infected leukocytes into the spinal cord, as well as the dysregulation of the blood-brain barrier. Studies have already shown that T and B cells, dendritic cells, macrophages, and monocytes are the cell types infected by the virus. Alarmins are endogenous molecules, also known as Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs), released due to mechanisms of stress, injury or cell death during the inflammatory process. The protein, called WARS, plays a role in catalyzing the binding of the amino acid tryptophan to its cognate transfer RNA during protein translation, but it can be released as alarmin during infectious responses. Studies with WARS alarmin show that this protein can inhibit replication *in vivo* and *in vitro* and high levels found in individuals infected with viruses such as human cytomegalovirus (CMV) and Hepatitis B virus. This alarmin induces the secretion of IFN β , IL-6 and protein kinase R production (PKR). However, about the role of WARS during HTLV-1 infection and HAM/TSP development remain unknown. Thus, we propose to analyze the expression of WARS alarmin in cells permanently infected by HTLV-1 (MT2), as in subpopulations of T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes obtained from HTLV-1-infected individuals, asymptomatic carriers (AC) and with HAM/TSP. The results indicate that WARS alarmin is expressed and secreted in immortalized cells infected by HTLV-1. The results also suggested that WARS in T CD8⁺ lymphocytes (naive, central memory and effector) from AC donors were reduced compared to the levels found in cells obtained from non-infected individuals or HAM/TSP patients. The peripheral blood mononuclear cells from HTLV-1-infected patients released WARS after stimulation with the TAX viral peptide. In conclusion, these results suggested that WARS secretion may be modulated during HTLV-1 infection.

Keywords: HTLV-1, MAH/PET, WARS, Alarmins.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATL - Leucemia de células T do adulto
- ATLL – Leucemia/linfoma de células T do adulto
- CD - Cluster de Diferenciação
- DC - Célula dendrítica
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- RNA - Ácido ribonucleico
- dsDNA - Dupla fita de ácido desoxirribonucleico
- FL-WRS Full Length WARS
- GLUT-1 - Transportador de glicose 1
- 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- γ - Interferon gama
- IL - Interleucina
- IN - Integrase
- 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
- NRP-1 - Receptor de neuropilina-1
- ORF - Sequências de leitura aberta (*Open Reading Frames*)
- RIPA - Tampão de ensaio de radioimunoprecipitação (Radioimmunoprecipitation assay buffer)
- SFB - Soro fetal bovino
- SNC - Sistema nervoso central
- ssRNA - fita simples de ácido ribonucleico
- T2-WRS/mini-WRS - triptofano-tRNA sintetase (forma clivada)
- TCA – Ácido Tricloroacético
- TNF- α – fator de necrose tumoral-alfa
- TR – Transcriptase reversa

tRNA – RNA transportador

VCAM – 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*)

WARS – triptofano-tRNA sintetase

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV 1)	1
1.1.1 Propriedades Gerais do HTLV-1.....	1
1.1.2 Replicação Viral.....	5
1.1.3 Epidemiologia do HTLV-1 no Brasil e no mundo.....	7
1.1.4 Transmissão.....	8
2. Doenças associadas a infecção pelo HTLV-1.....	10
2.1 Mielopatia associada ao HTLV-1.....	10
2.1.1 Resposta imunológica e o desencadeamento da MAH/PET.....	12
2.1.2 Alarmina Triptofano tRNA sintetase (WARS).....	14
3. JUSTIFICATIVA.....	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1 Objetivo Geral.....	17
4.2 Objetivos específicos.....	17
5. METODOLOGIA.....	17
5.1 Cultura de células MT-2 e Jurkat.....	17
5.2 Obtenção de amostra de pacientes com HTLV-1.....	18
5.3 Obtenção de células mononucleadas de sangue periférico (PBMC).....	18
5.4 Marcação intracelular da proteína WARS.....	18
5.5 Precipitação de proteínas.....	19
5.6 Western Blot.....	20
5.7 Análise Estatística.....	20
6. RESULTADOS.....	21
6.1 Expressão de WARS em células da linhagem MT-2 e Jurkat.....	21
6.2 Expressão de WARS em células T CD4+ e CD8+.....	24
6.3 Secreção de WARS em cultura de PBMCs de pacientes infectados pelo HTLV-1.....	31
7. DISCUSSÃO.....	32
8. CONCLUSÃO.....	33

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 33

1. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus linfotrópico para células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)

O vírus HTLV-1 foi primeiramente isolado em 1980, com o nome de HTLV apenas, a partir de uma amostra do sangue periférico de um paciente de 28 anos com diagnóstico de um linfoma cutâneo de célula T, nele foi detectado por ensaio de PCR e microscopia eletrônica a presença do vírus (Poiesz *et al.*, 1980; Gallo, 2005). A partir dessa amostra os linfócitos T foram cultivados com a interleucina 2 (IL-2), fazendo assim o estabelecimento de uma linhagem imortalizada das células, que recebeu o nome de HUT-102. Nessas células havia a presença da enzima transcriptase reversa e partículas virais, e a partir desta evidência o vírus foi denominado *Human cutaneous T-cell Lymphoma Virus*, ou *HTLV* (Poiesz *et al.*, 1980).

Na mesma década, em 1981, partículas do HTLV-1 foram identificadas em células mononucleares do sangue periférico, em pacientes com leucemia de células T do adulto (ATL), no sudoeste do Japão (Hinuma *et al.*, 1981). O vírus então descrito pelos pesquisadores japoneses foi nomeado ATLV (vírus de células T da leucemia do adulto) e após análises comparativas do vírus HTLV e ATLV, foi então definida a sigla HTLV-1 como a nova nomenclatura para o vírus (Gallo, 2005).

Em 1982, Kalyanaraman isolou o vírus HTLV-2 de 1 paciente portador da leucemia de células pilosas (tricoleucemia). Células T foram extraídas do rim desses pacientes, nas quais se encontraram antígenos do HTLV. Foi identificada cerca de 66% de homologia com o vírus HTLV-1, mas menos patogenicidade. (Kalyanaraman *et al.*, 1982). Mais recentemente, foram identificados na África Central os vírus HTLV-3 e HTLV-4, em gorilas e outros primatas não humanos. No entanto, não há, desde então, descrição de evidências de doenças associadas a essas variantes genótípicas (LeBreton *et al.*, 2014), enquanto os vírus HTLV-1 e HTLV-2 possuem relevância clínica e epidemiológica, sobretudo o HTLV-1, por ter um potencial oncogênico (VF da Silva Lima *et al.*, 2021).

1.1.1 Propriedades Gerais do HTLV-1

O HTLV-1 é um retrovírus da família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretroviridae* e gênero *Deltaretrovirus* (Afonso *et al.*, 2019). Sua distribuição é mundial, sendo primeiramente detectado como vírus endêmico na região sudoeste do Japão e em regiões como: Oeste da

África, África Central, América Latina (Gessain e Cassar, 2012). Sugere-se que variantes genotípicas HTLV-1, HTLV-2 e HTLV-3 foram originadas através de múltiplas infecções das suas contrapartes em espécies de primatas como chimpanzés e macacos como os vírus linfotrópicos de células T símias: STLV-1, STLV-2 e STLV-3. (Le Breton *et al.*, 2014).

A partícula viral do HTLV-1 é envelopada, medindo entre 100 e 120 nanômetros. O seu genoma viral compõe duas fitas RNA simples de polaridade positiva, assim como também tem enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (Tangy, 1996). Também possui proteínas transmembranares como gp21 e gp46 que estão situadas no envelope viral e são essenciais para a ligação do mesmo com o receptor celular (**Figura 2**), assim como a fusão do vírus com a membrana da célula alvo (Tangy, 1996, Fogarty *et al.*, 2011). A terminação 5' do genoma do HTLV-1 possui genes responsáveis pela codificação de proteínas enzimáticas e estruturais (**Figura 3**). Há os genes responsáveis pela codificação das proteínas de matriz, capsídeo e nucleocapsídeo (genes *gag*); os genes que codificam as enzimas RNase, protease, transcriptase reversa e endonuclease (genes *pol*); e os genes das proteínas transmembranares gp21 e gp46 (gene *env*). Todos esses genes são intercalados por repetições terminais longas, ou LTR (*Long Terminal Repeats*) (Seiki *et al.*, 1983).

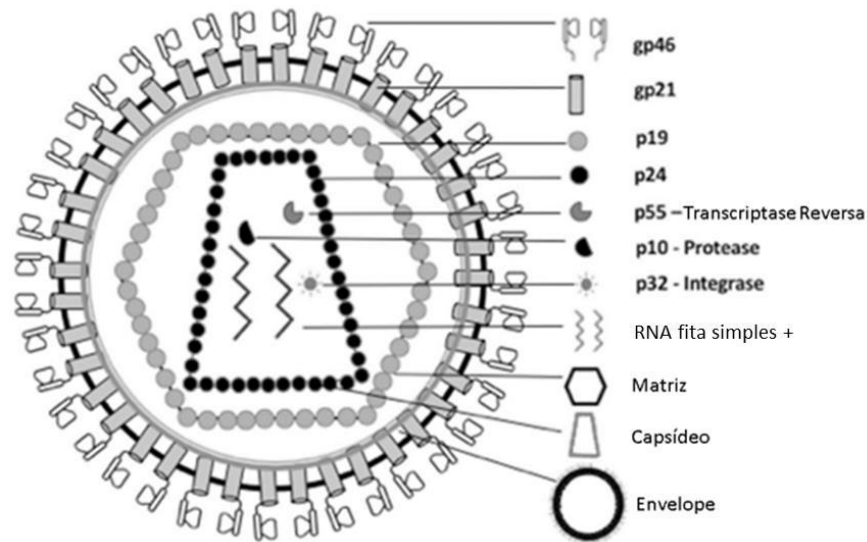


Figura 2. Representação esquemática da estrutura e composição do HTLV-1. Proteínas do capsídeo (p24), o genoma de RNA de fita simples (ssRNA⁺), as enzimas transcriptase reversa (p55), protease (p10) e integrase (p32). A matriz viral é delimitada pela proteína P19, que envolve o núcleocapsídeo. A camada do envelope é constituída pelas glicoproteínas gp46 e gp21. Figura adaptada de *Brites et al.*, 2021.

Para as proteínas regulatórias e acessórios do vírus, há uma região denominada *pX* que se encontra entre a terminação 3' e o gene *Env* (Seiki *et al.*, 1983). Nessa região, há 4 sequências de leitura aberta (*Open Reading Frames*, ou ORF), ORF I, ORF II, ORF III, ORF IV que sofrem *splicing* alternativo e determinam mRNAs para as proteínas acessórias e reguladoras como Tax, Rex, p12, p21, p30, p13 e gene HBZ (**Figura 3**; revisado por Yoshida, 2010). O HBZ se posiciona na porção anti-sense do genoma do HTLV-1 (Gaudray *et al.*, 2002)

A ORF I codifica para a proteína p12 do vírus HTLV-1, esta proteína é essencial para a infecção do vírus e se localiza no espaço intracelular (Albrecht *et al.*, 2000). Essa proteína viral também pode ser encontrada no retículo endoplasmático (ER), onde se liga à molécula de MHC I imatura e impede a sua associação com β 2-microglobulina ou inibe o transporte do MHC I para o Complexo de Golgi (Johnson *et al.*, 2001), comprometendo a expressão de MHC I por células infectadas e reduzindo a sua eliminação por linfócitos citotóxicos. Essa proteína também está envolvida na persistência viral através do aumento da proliferação celular mediada pela produção de interleucina 2 (IL-2) por células infectadas. A p12 atua amplificando a ativação do fator de transcrição NFAT por sua interação com proteínas reguladoras de Ca^{+2} residentes do

ER como a calreticulina e calnexina (Ding *et al.*, 2001; Albrecht *et al.*, 2002). Além disso, a proteína p12 está associada a infecção de novas células através de projeções de células dendríticas infectadas com HTLV-1 (Valeri *et al.*, 2010). A ORF II codifica a proteína p13, que é encontrada a mitocôndria sua expressão foi associada a produção de espécies reativas de oxigênio, cujos níveis podem influenciar o desencadeamento de apoptose (Koralnik *et al.*, 1992, Van Prooyen *et al.*, 2010). A ORF III codifica a proteína Rex, que é uma proteína regulatória pós-transcricional, tendo a função de promover a exportação do mRNA do HTLV-1 completo antes do *splicing*, desta forma, a função da proteína Rex é essencial para uma transcrição eficaz do HTLV-1 (Hidaka *et al.*, 1988). A ORF IV produz mRNA para síntese da proteína Tax. A proteína HBZ (*HTLV 1 basic zipper factor*) é transcrita através da tradução de uma região antisense 3' LTR (Edwards *et al.*, 2011).

A proteína Tax exerce um papel de regulação da transcrição viral através do recrutamento de fatores de transcrição para o terminal 5'LTR. Esse mecanismo, associado as funções de sinalização da proteína faz da Tax uma molécula crucial para a transcrição do vírus HTLV-1 (Yao e Wigdahl, 2000; Matsuoka, 2011). A proteína Tax altera a atividade celular através da ativação de vários fatores de transcrição, como por exemplo, NF- κ B, AP1 e CREB. A modulação do NF- κ B pela proteína viral Tax modula a expressão de VCAM e VEGF, estresse oxidativo, produção de citocinas (IL-8, IL-15, TNF α) e a proliferação celular (IL-2, c-Myc) entre outras funções (Hiscott *et al.*, 2001; Zhi *et al.*, 2011). Além disso, a Tax está diretamente envolvida no processo de transformação celular via NF- κ B, induzindo proteínas antiapoptóticas, como por exemplo, Bcl-xl, e através da inibição de genes supressores de tumor (Yamaoka *et al.*, 1996; revisado por Yoshida, 2010). A proteína Tax também está associada a indução de proto-oncogenes (Yoshida, 2010) Por outro lado, combinadas as proteínas p27, p21 e Tax estão associadas à senescência celular (Zhi *et al.*, 2011).

A proteína HBZ também está associada com a indução de proliferação celular (Satou *et al.*, 2006) e pode ser considerada oncogênica, visto que camundongos transgênicos para HBZ desenvolvem linfomas (Satou *et al.*, 2011). A proteína HBZ aumenta a infectividade e a persistência viral. Fato confirmado *in vivo* através da infecção de coelhos com HTLV-1 contendo HBZ mutada e sem funcionalidade (Arnold *et al.*, 2006).

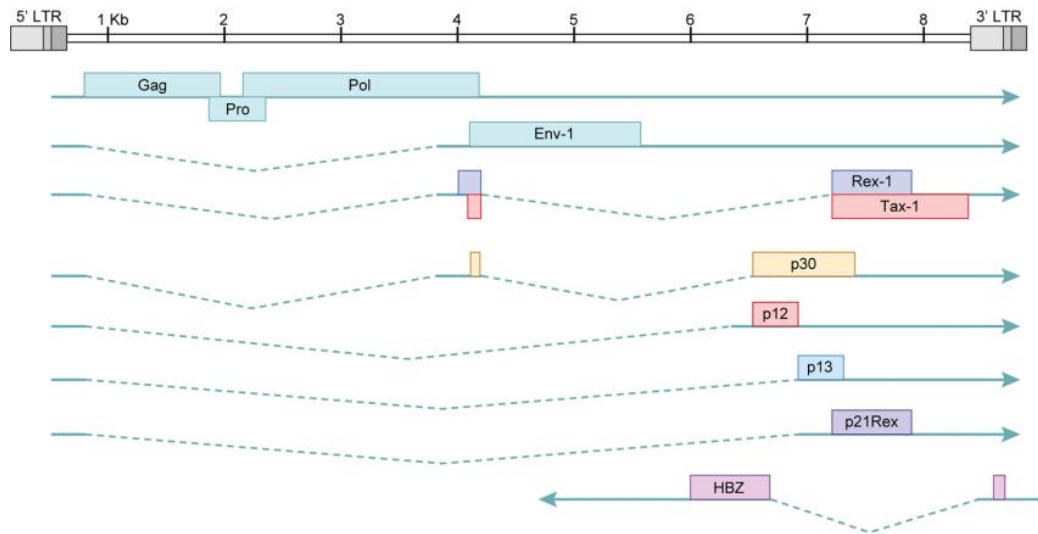


Figura 3. Representação esquemática do genoma do HTLV-1 e os seus transcritos e proteínas associadas. Genes gag, pro, pol e env estão flanqueados por segmentos LTR. A região entre Env-1 e 3' LTR sofre um splicing em regiões distintas e origina a síntese de proteínas reguladoras e acessórias como: Tax, Rex, p21, p12, p13, p30 e HBZ (gene antisense) (Figura adaptada de Martinez *et al.*, 2019).

1.1.2 Replicação Viral

O HTLV-1 é capaz de infectar principalmente, células T CD4⁺, em menor número também já foi descrito a infecção de células T CD8⁺ (Franchini *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 1995), linfócitos B e células mieloides, como células dendríticas (Macatonia *et al.*, 1992), macrófagos e monócitos (Franchini *et al.*, 1995; Koralnik *et al.*, 1992; Koyanagi *et al.*, 1993; Cho *et al.*, 1995; Makino *et al.*, 2000; Hishizawa *et al.*, 2004; Nascimento *et al.*, 2011; de Castro-Amarante *et al.*, 2015; Echevarria-Lima *et al.* 2018). A principal hipótese para o processo de entrada do HTLV-1 é da interação célula a célula, pela qual uma célula infectada, interage com uma célula não infectada e as proteínas transmembranares do vírus adjacente a célula infectada interage com receptores celulares da célula não infectada. (Ahmadi *et al.*, 2021). Através desse contato ocorre a entrada do vírus pela sinapse virológica, onde há a formação de um agregado supramolecular, que inicia a entrada do vírus. Nesse cenário, as proteínas do envelope são responsáveis pela adesão e entrada da partícula viral na célula (Bangham *et al.*, 2003; Igakura *et al.* 2003; Huang *et al.*, 2009).

Macromoléculas encontradas na membrana plasmática celular, como por exemplo, proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG), o transportador de glicose 1 (GLUT-1), Neuropilina

1 (NRP-1) e a molécula de adesão ICAM-1 foram associadas à entrada do HTLV-1 nas células alvo (Manel *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2005; Ghez *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2009).

A proteína viral gp46 quando interage com a Neuropilina 1, sofre uma alteração conformacional, promovendo a sua ligação ao GLUT-1. Essa interação causa a fusão do vírus com a célula alvo, mediada pela proteína do envelope viral gp21, liberando assim o genoma viral no citoplasma da célula hospedeira (Jones *et al.*, 2011).

Após a fusão, o RNA genômico do vírus passa por transcrição reversa pela transcriptase viral no citoplasma para converter o RNA genômico em DNA de dupla fita. O DNA de dupla fita é transportado para o núcleo da célula, e assim é integrado ao genoma da célula para formar o provírus (Martin *et al.*, 2016). Através de estudos com centenas de sítios de integração do HTLV-1, não foi possível definir um critério pelo qual o vírus HTLV-1 irá se integrar no genoma da célula (Gillet *et al.*, 2011; Cook *et al.*, 2014). Em alguns estudos observou-se um padrão na integração do vírus no genoma, sendo mais frequente a integração ocorrer em locais com alta atividade transcricional (Niederer *et al.*, 2014). Em seguida ocorre a transcrição e tradução do genoma viral e a formação de novas partículas virais do HTLV-1 (Olière *et al.*, 2011). Na figura 4 encontram-se esquematizadas as etapas descritas acima.

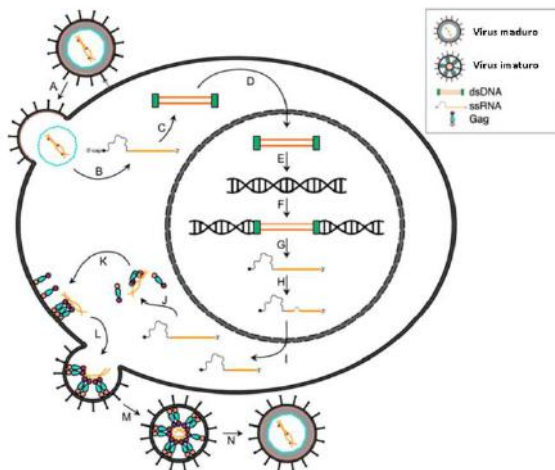


Figura 4. Esquema representativo do ciclo de replicação do HTLV-1. O envelope do vírus HTLV-1 funde com a membrana celular pela interação dos receptores GLUT-1, HSPG e NRP-1 com a proteína de superfície viral gp46/gp21, formando um complexo molecular. (A) O RNA viral é liberado no citoplasma após a fusão (B), o RNA é transcrito em DNA de fita dupla (dsDNA) através da transcriptase reversa do vírus (C). O dsDNA é transportado para o núcleo (D), sendo integrado ao DNA da célula (E, F). O provírus é transcrito pela RNA polimerase II da célula (G); os mRNAs virais passam por modificações pós-transcricionais (H). Os mRNAs virais são direcionados do núcleo para o citoplasma (I), e as proteínas do vírus são processadas pela maquinaria enzimática da célula infectada (J). As proteínas Gag, Gag-Pol e Env são transportadas para a membrana plasmática da célula, com as duas cópias do RNA do vírus recém produzido (K). O RNA e as proteínas virais iniciam a

formação da partícula viral ao se ligarem próximo à membrana da célula (L). A partícula viral é liberada da célula por brotamento (M) e passa por um processo de maturação em função da protease viral, clivando as poliproteínas virais para resultar numa partícula viral madura e infecciosa (N). Figura adaptada de Martin *et al.*, 2016.

1.1.3 Epidemiologia do HTLV-1 no Brasil e no mundo

É estimado que 10 a 20 milhões de indivíduos no mundo vivam com o HTLV-1, sendo as áreas de maior distribuição geográfica do vírus: África, Américas do Sul e Central, as Ilhas Caribenhas e o Japão (Figura 5; Proietti *et al.*, 2005; Gessain e Cassar, 2012).

Vários estudos relatam que existe uma associação entre regiões com nível baixo de educação e de condições socioeconômicas com uma maior prevalência do vírus HTLV-1 em áreas endêmicas e não endêmicas (Murphy *et al.*, 1991; Schreiber *et al.*, 1997; Manns *et al.*, 1999; Catalan-Soares *et al.*, 2003; Sanchez-Palacios *et al.*, 2003).

Na América do Sul, vários estudos sobre a prevalência do vírus foram conduzidos no Brasil, Chile, Peru, Argentina, Guiana Francesa e Colômbia, o continente compreende a maior área endêmica para a infecção do HTLV-1 e suas doenças associadas (Gessain e Cassar, 2012).



Figura 5. Distribuição Mundial do HTLV-1. O mapa apresenta as regiões com alta prevalência de indivíduos infectados com HTLV-1. Os círculos representam o número estimado de pessoas infectadas. Figura adaptada de Gessain e Cassar, 2012.

A depender da localização, a soroprevalência para HTLV-1 é heterogênea dentre doadores de sangue, variando de 0,04% a 1%, sendo maior nas regiões Norte e Nordeste do que

na região Sul do Brasil (**Figura 6**). No estado da Bahia, a prevalência é de 1,7% de indivíduos infectados, e 1,05% dentre amostras de sangue de gestantes. Já no estado do Rio de Janeiro, a cada 1000 doadores de sangue, 4,7 são indivíduos infectados com HTLV-1, correspondendo a prevalência nacional de 4,8 indivíduos (Catalan-Soares *et al.*, 2005). Esses dados apontam o Brasil como o país com o maior número absoluto de portadores do HTLV-1 no mundo (VF da Silva Lima *et al.*, 2021).

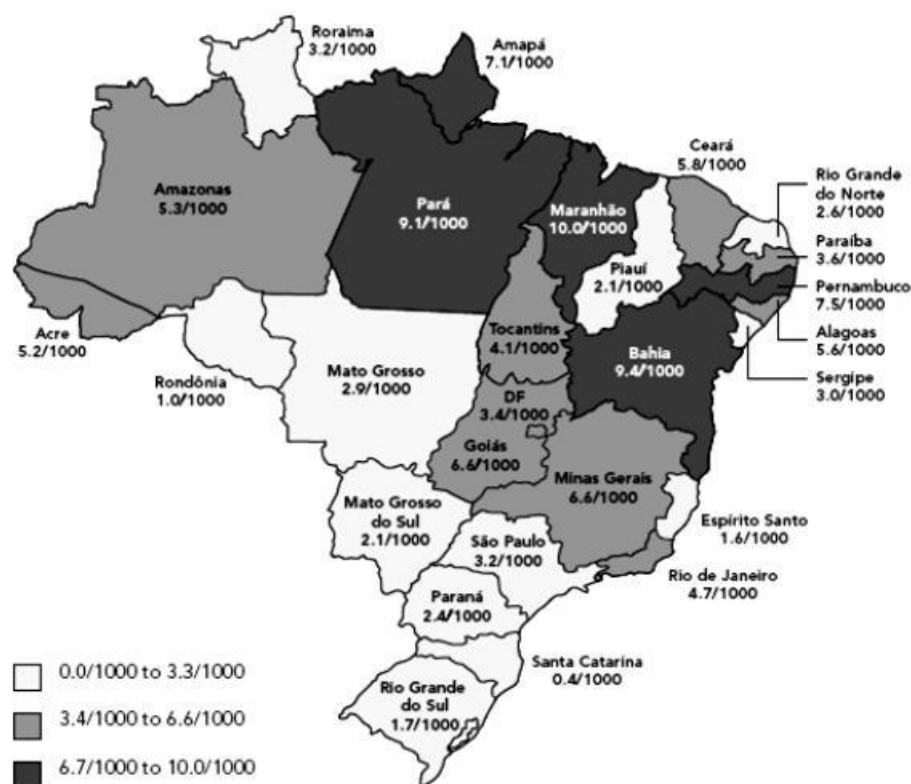


Figura 6. Representação de prevalência da infecção pelo HTLV-1 em regiões do Brasil. O mapa demonstra a infecção pelo HTLV-1 no Brasil através de amostras de bancos de sangue. Figura adaptada de Catalan Soares e Proietti, 2005.

1.1.4 Transmissão

A transmissão pelo HTLV-1 entre indivíduos pode ocorrer por 3 mecanismos: transmissão vertical através da amamentação de uma mãe infectada com o vírus para a criança, relações sexuais sem proteção e contaminação com sangue de indivíduos infectados (Okochi *et al.*, 1984; Kaplan *et al.*, 1996; Hino *et al.*, 2011).

Partículas virais livres não são encontradas com facilidade no plasma de indivíduos com HTLV-1, sendo provável que a transmissão ocorra entre as células, sobretudo através de linfócitos T (Pique *et al.*, 2012).

Como já mencionado para o HTLV-1, o contato célula-célula é mais eficiente que os outros processos de infecção viral (Fan *et al.*, 1992), estes mecanismos podem ser: sinapse virológica, formação de conduítes ou projeções celulares, formação de aglomerados virais extracelulares e transinfecção mediada por células dendríticas (Figura 7). No caso de a transmissão envolver regiões de mucosa, as células alvo residentes são infectadas, como por exemplo, macrófagos, que atravessam a barreira epitelial. As células infectadas pelo HTLV-1 podem atravessar a região de mucosa rompida ou liberar partículas virais que atravessam o epitélio por transcitose. Além disso, células infectadas podem infectar células epiteliais, que liberam os vírions pela membrana basal. Esses processos possibilitam a chegada do vírus em outros locais do hospedeiro contendo novas células não infectadas (Carpentier *et al.*, 2015).

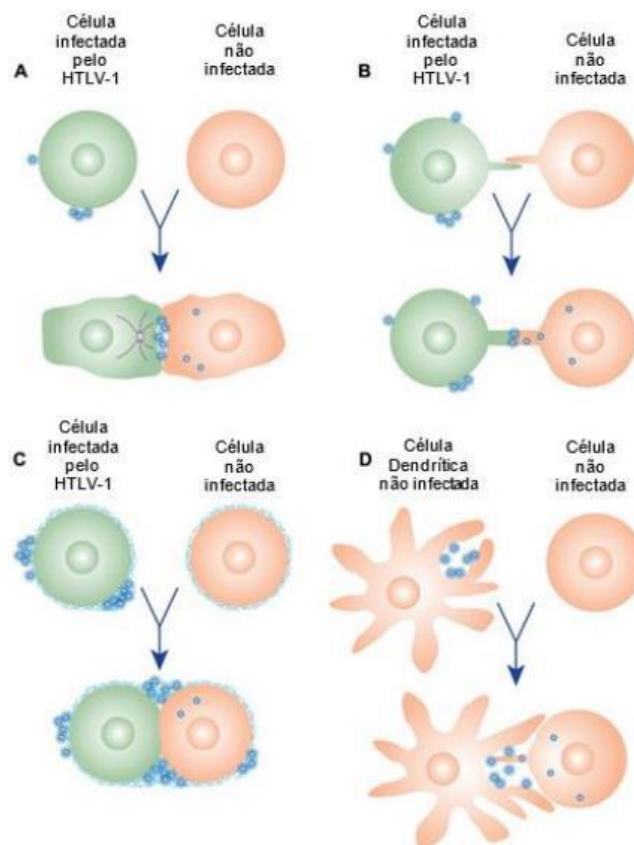


Figura 7. Transmissão do HTLV-1 por contato célula-célula. As células em verdes representam células infectadas pelo HTLV-1, as células em rosa representam células não infectadas. (A) Sinapse virológica; (B) Formação de conduítes celulares; (C) Aglomerados virais extracelulares; e (D) Transinfecção mediada por células dendríticas (DCs). Figura adaptada de Pique *et al.*, 2012.

A proteína Tax tem um papel importante na formação da sinapse viral, pois regula a formação do centro de organização dos microtúbulos da célula, assim como promove a expressão da ICAM-1, que interage com a LFA-1 da célula não infectada, favorecendo as condições para a sinapse viral (Nejmeddine *et al.*, 2010). A formação dos aglomerados virais extracelulares consiste em uma espécie de biofilme viral onde partículas virais do HTLV-1 ficam retidas na superfície celular das células T infectadas através de proteínas de matriz extracelular como colágeno, agrina, galectina-3 e tetherina (**Figura 7C**).

2. Doenças associadas a infecção pelo HTLV-1

As manifestações clínicas causadas pelo HTLV-1 podem ser categorizadas em duas principais classificações: as neoplásicas, como a ATLL (Leucemia/Linfoma de células T adulto) e as inflamatórias, determinada pelo desenvolvimento da mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espática tropical (MAH/PET). A ATL é definida como uma manifestação maligna de linfócitos T CD4⁺ infectados com HTLV-1 que se transformam e proliferam após uma infecção crônica de longo prazo, e possui subtipos clínicos denominados aguda, crônica, linfomatosa e indolente (Ahmadi *et al.*, 2021)

A prevalência da ATL entre os indivíduos vivendo com HTLV-1, após infecção por via vertical, em áreas endêmicas compreende 2 a 5% dos indivíduos infectados (Hino *et al.*, 1989; Iwanaga *et al.*, 2012). O subtipo indolente corresponde ao estágio inicial da doença e ao longo do tempo pode se desenvolver no estágio agudo (Tsukasaki *et al.*, 2009). Os sintomas da ATL são numerosos e é determinado pelo subtipo presente no indivíduo infectado. Dor abdominal, diarreia, efusão pleural, tosse, febre, infecções oportunistas icterícia são alguns dos sintomas característicos associados a pacientes com ATLL (Uchiyama *et al.*, 1977; Uchiyama *et al.*, 1997).

Doenças como artrite, desordens do trato urinário, fibromialgia e depressão são associadas a pacientes vivendo com HTLV-1 (Cruz *et al.*, 2006; Mori *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2007; Stumpf *et al.*, 2008).

2.1 Mielopatia associada ao HTLV-1

A MAH/PET é uma doença inflamatória, crônica, progressiva e incapacitante com danos ao sistema nervoso central (SNC), como a perda da bainha de mielina e axônios. Suas manifestações clínicas são compreendidas por paraparesia espástica, dor lombar, neuropatia periférica, alterações cognitivas com perda da bainha de mielina e de axônios (Richardson *et al.*, 1990; Silva *et al.*, 2003; Leite *et al.*, 2004).

Primeiramente, o desenvolvimento da doença inicia-se pela infiltração de células mononucleares infectadas pelo HTLV-1 no SNC, destruição da mielina, axônios e gliose, sendo nomeada de fase inflamatória. Normalmente, o infiltrado é localizado anatomicamente na porção torácica superior da medula espinhal (Izumo *et al.*, 1992). O infiltrado possui uma predominância de células T CD4⁺, CD8⁺ e fagócitos (Izumo *et al.*, 1992; Enose-Akahata *et al.*, 2012). Após essa fase inicial da doença, é possível identificar alterações macroscópicas no SNC de um paciente com MAH/PET, com atrofia da medula espinhal e neurodegeneração (Iwasaki *et al.*, 1992; Nagai *et al.*, 1998).

Pacientes com MAH/PET tem mobilidade afetada, sobretudo nos membros inferiores, sendo muitas vezes necessário o uso de andadores, muletas e em alguns casos, cadeira de rodas. Quedas constantes são frequentemente registradas em pacientes com MAH/PET, assim como lesões derivadas de quedas, sendo a fraqueza nos membros inferiores uma das principais razões (Facchinetti *et al.*, 2013). Os pacientes podem apresentar progressão da doença rápida (necessidade de cadeira de rodas em até 5 anos após o diagnóstico), lenta e contínua (evolução entre 20 e 30 anos para o uso de cadeira de rodas), lenta e descontínua (evolução entre 20 e 30 anos para o uso de andadores), muito lenta (distúrbios da marcha com incapacidade motora leve, como dificuldade de locomoção necessitando do auxílio de bengalas). Além disso, há pacientes que apresentam uma evolução muito lenta com distúrbios da marcha e incapacidade motora leve, necessitando apenas do auxílio de bengalas (**Figura 8**; Yamano e Sato, 2012).

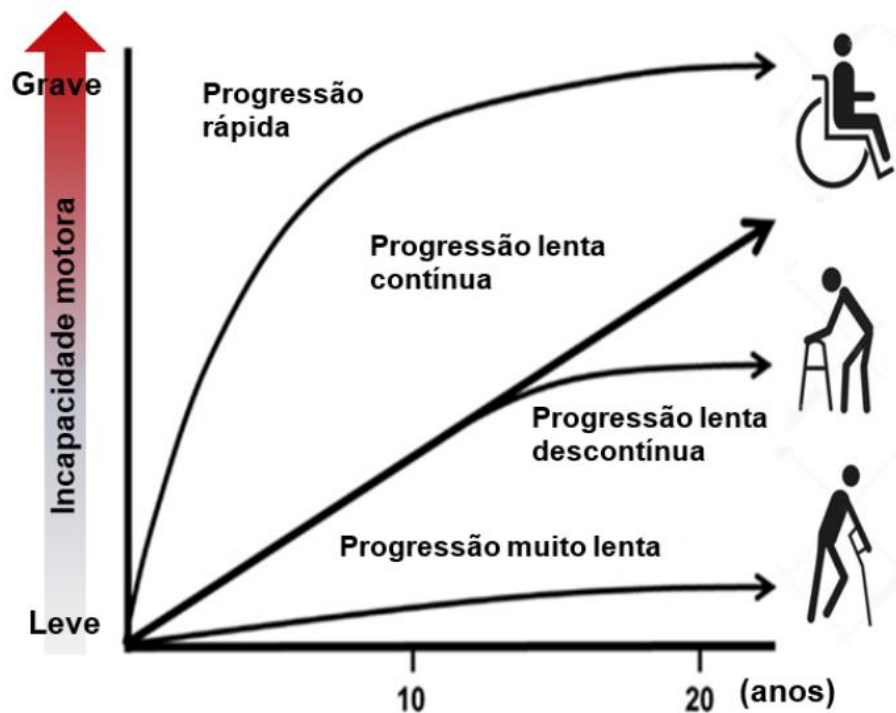


Figura 8. Representação esquemática do curso clínico da MAH/PET. Tipos de progressão da MAH/PET. Diferenças entre o tempo de latência, o início dos sintomas e necessidade de uso de cadeira de rodas (Adaptado Yamano e Sato, 2012).

2.1.1 Resposta imunológica e o desencadeamento da MAH/PET.

A frequência de células T CD4⁺ com perfil Th1 em pacientes com MAH/PET pode ser 25 vezes maior quando comparada com a frequência em pacientes assintomáticos. O principal subtipo encontrado em pacientes com a doença é o Th1 (Goon *et al.*, 2002). O principal antígeno reconhecido pelas células T CD4⁺ infectadas com HTLV-1 é a proteína Env, seguido das proteínas Gag e Pol (Goon *et al.*, 2002).

É proposto que, especificamente, o IFN- γ possui um papel crucial na patogênese da doença, pois a expressão e produção desta citocina é modulada positivamente pela proteína viral Tax (Hanon *et al.*, 2001). Além disso, observa-se também níveis aumentados de TNF- α , GM-CSF, IL-2, IL-15 (Nishiura *et al.*, 1996; Higuchi *et al.*, 1997; Bangham, 2003; Barmak *et al.*, 2003). A entrada de células no SNC está diretamente associada a elevada produção de quimiocinas como CCL2 (Umehara *et al.*, 1996), CXCL10, CXCL9 e CCL5 (Narikawa *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2008; Yamano *et al.*, 2013; Ando *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2022). Estudos

mostram que pacientes com MAH/PET possuem no seu endotélio, maior expressão das proteínas VCAM-1, VLA-4 e MCP-1, que são responsáveis pela adesão celular, quando comparada com indivíduos não infectados (Gessain and Mahieux, 2012; Biswas *et al.*, 2009; Izumo, 2010; Nagai and Osame, 2003). A **figura 9** representa o modelo *bystander* para explicar a patogênese da MAH/PET, no qual se propõe que células T infectadas, expressando a proteína viral Tax, ultrapassam a barreira hemato encefálica (BBB) e atingem a medula espinhal. Por sua vez, o IFN γ liberado pelas células T infectadas estimulam os astrócitos a secretarem CXCL10, promovendo o recrutamento de células T. O fator de transcrição, T-bet que quando induzido, direciona as células T CD4⁺ para um perfil de resposta Th1. Além disso, a quimiocina CCL22 que é secretada pelas células T infectadas pelo HTLV-1, aumentam a sobrevivência das células que expressam CCR4. Assim, se estabelece um foco auto perpetuante de inflamação.

A carga viral do HTLV-1 e a expressão da proteína Tax são detectadas com maior frequência no líquido cefalorraquidiano do que nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes com MAH/PET (Nagai *et al.*, 2001; Moritoyo *et al.*, 1999). Linfócitos infectados com HTLV-1 compartilham do mesmo sítio de integração no DNA celular (sequências flanqueadoras do provirus do HTLV-1), estes dados mostram que os linfócitos infectados com HTLV-1 migram da periferia para o SNC (Cavrois *et al.*, 2000; Yamano *et al.*, 2010).

Por outro lado, os interferons do tipo 1, como o IFN β interferem negativamente na replicação do HTLV-1, assim como IFN α , que inibe a infecção do vírus em estágios tardios de replicação viral em função da ativação do gene PKR (Proteína quinase R), proteína associada a diminuição da síntese proteica viral (Cachat *et al.*, 2013).

É possível detectar que uma série de genes estimulados por IFNs do tipo I e II, são expressos nos leucócitos de indivíduos com MAH/PET (Tattermusch *et al.*, 2012). Genes induzidos por IFN modulam efeitos antivirais e neuroprotetivos (Randall *et al.*, 2008). Entretanto, estudos recentes implicam a participação do IFN em patogêneses de desordens autoimunes como artrite reumatoide, lúpus eritematosos e síndrome de Sjögren (Emamian *et al.*, 2009; Baechler *et al.*, 2003; Kraan *et al.*, 2007).

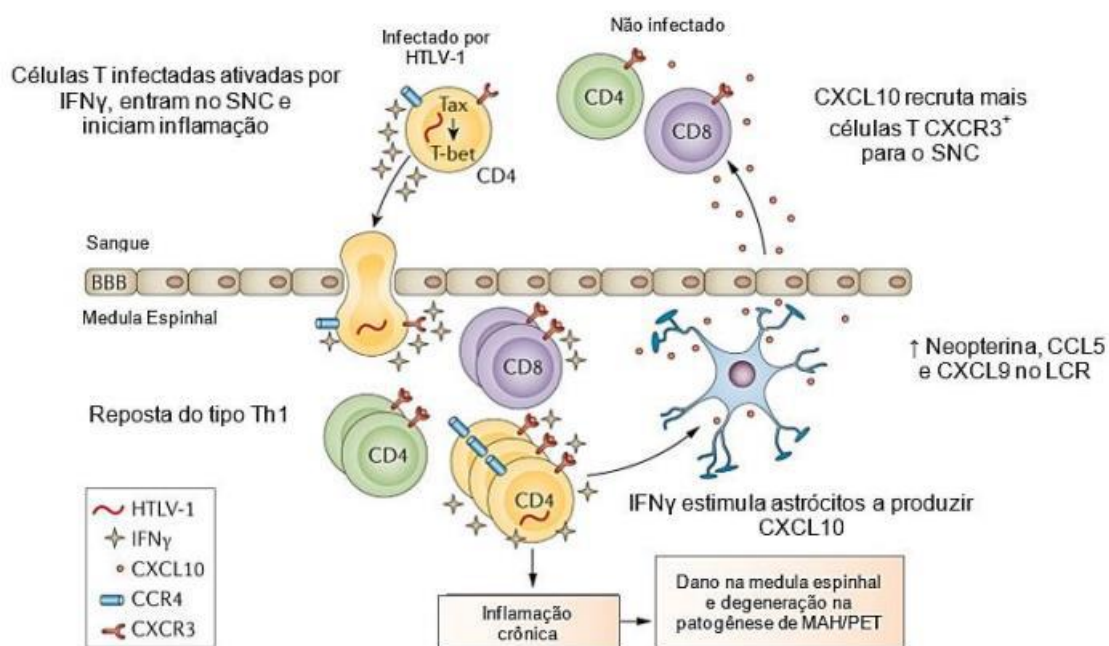


Figura 9. Modelo *bystander* para explicar a patogênese da MAH/PET. Esquema representativo do dano tecidual e desenvolvimento da MAH/PET. Linfócitos T CD4⁺ CCR4⁺ CXCR3⁺ atravessam a barreira hematoencefálica (BBB) alcançando o SNC. IFN γ expresso pelas células T infectadas estimulam os astrócitos a secretarem CXCL10. Níveis aumentados de CCL5 e CXCL9 no líquido cefalorraquidiano (LCR), envolvidos no recrutamento de linfócitos T juntamente com CXCL-10. Foco autoperpetuante de inflamação. Figura adaptada de Bangham *et al.*, 2015.

2.1.2 Alarmina Triptofano tRNA sintetase (WARS)

Em 2019, Lee e seus colaboradores sugeriram que a proteína WARS (Triptofano tRNA Sintetase) poderia ser caracterizada como uma alarmina. As alarminas são moléculas endógenas, também conhecidas como Padrões Moleculares Associados ao Dano (DAMPs) associadas às respostas pró-inflamatórias. Elas podem ser liberadas em função de mecanismos de estresse, lesão ou morte celular, podendo ser desencadeados pela presença de patógenos. Essas moléculas interagem com receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como por exemplo, receptores do tipo Toll, resultando numa complexa sinalização celular com função efetora do sistema imune. HMGB1, IL-1 α e IL-33 são alguns exemplos de alarminas anteriormente descritas (Lotze, 2007; Foell, 2007).

A WARS é produzida constitutivamente, tendo papel canônico na catalisação da ligação do aminoácido triptofano ao seu tRNA cognato durante a tradução proteica das células, entretanto, esta molécula possui papéis não canônicos (Jin, 2019). A alarmina WARS pode ser

encontrada sob duas formas, FL-WRS (*Full Length WARS*), sua forma íntegra e a mini-WRS ou T2-WRS (forma truncada da porção N-terminal da enzima). A FL-WRS é sua forma nativa, capaz de interagir com receptores da resposta imune e com função na tradução celular de mRNAs. É descrita como uma molécula capaz de atuar como um ligante de TLR2 e TLR4 na regulação da resposta imune no início da infecção (Lee *et al.*, 2019). A alta expressão de FL-WRS já foi descrita em infecções de *Salmonella typhimurium*, *Candida albicans* e *Escherichia coli*, podendo ter um papel em potencial na resposta imune contra patógenos (Ahn *et al.*, 2016). WARS encontra-se expressa em níveis aumentados em indivíduos infectados pelo citomegalovírus humano (CMV) e o vírus da Hepatite B (Wieland *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 1998). Em 2019, Lee e colaboradores analisam a expressão da WARS em células imunes infectadas por vírus e constatam a indução e secreção de IFN β , IL-6, PKR, além da inibição da replicação do vírus *in vivo* e *in vitro*.

A FL-WRS tem capacidade de modular a fosforilação da p53, importante molécula no controle do ciclo celular, reparo de DNA e supressão de tumores. No núcleo, a WRS interage com a molécula poli (ADP-ribose), polimerase (PARP-1), p53 e a proteína quinase dependente de DNA (DNA-PKcs), resultando em um complexo molecular que tem efeitos anticancerígenos na célula (**Figura 10**; Sajish *et al.*, 2012).

A FL-WRS pode atuar como um precursor da mini-WRS ou T2-WRS, que apresenta capacidade de modular a positivamente a angiogênese *in vitro* de forma semelhante a função do VEGF (Wakasugi *et al.*, 2020). A T2-WRS é resultante de uma clivagem proteolítica, na qual perdeu-se o domínio WHEP, que é responsável por interagir com receptores TLR. A T2-WRS apresenta uma função extracelular, podendo se ligar a caderina endotelial vascular (Caderina-VE ou CD144). Entretanto, a T2-WRS pode promover a inibição da neovascularização de tumores, apresentando neste contexto um papel antiangiogênico (**Figura 10**; Tzima *et al.*, 2006).

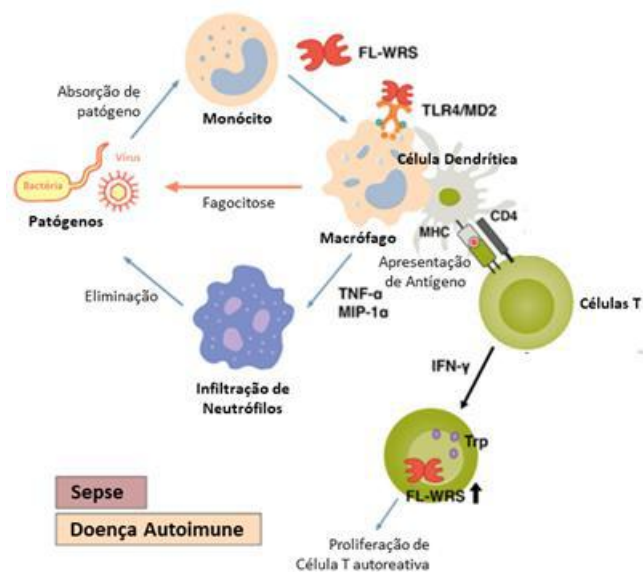


Figura 10. Papéis da alarmina WARS na regulação imune e sua relação com doenças. Após infecção ou estimulada pela presença de $IFN\gamma$, FL-WRS é secretado pelos monócitos para ativar macrófagos via TLR4/MD2, cuja resposta resulta em produção de citocinas e quimiocinas. Há recrutamento de neutrófilos, aumento da fagocitose para eliminação do patógeno. Linfócitos T também produzem WARS, promovendo aumento de proliferação. (Figura adaptada de Jin, 2019).

3. JUSTIFICATIVA

Ainda não se conhece os detalhes da patogênese e os mecanismos moleculares por trás do desenvolvimento da MAH/PET, doença causada pela infecção pelo HTLV-1, e que acomete um número significativo de pessoas em todo o mundo. O risco de desenvolvimento da MAH/PET foi associado à elevação da carga pró-viral (Silva *et al.*, 2007) e ao aumento dos níveis de CXCL10 e CXCL9 (Sato *et al.*, 2013). Entretanto, devido à infecção crônica causada pelo HTLV-1 e a complexidade da doença, outros parâmetros devem estar relacionados ao surgimento da MAH/PET.

Como mencionado anteriormente, a enzima WARS foi descrita como uma alarmina e tem seus níveis aumentados durante infecções fúngicas, bacterianas e virais. Além disso, na tese de doutorado de Sabrina Pires Maciel de Souza, membro do nosso grupo, análises *in silico* sugeriram que células mononucleares de sangue periférico, incluindo monócitos e macrófagos, de pessoas vivendo com HTLV-1 apresentam níveis elevados da proteína WARS. Resultados do nosso grupo também mostraram que macrófagos derivados de monócitos cultivados na presença de células infectadas pelo HTLV-1 apresentam um aumento nos níveis intracelulares de WARS. Também foi descrito a presença de níveis do mRNA para WARS durante a

diferenciação de macrófagos ou células dendríticas a partir de monócitos periféricos (Matsunaga *et al.*, 2002; Krause *et al.*, 1996). Assim, considerando os efeitos das proteínas virais do HTLV-1 sobre as células do sistema imunitário dos indivíduos acometidos com MAH/PET e assintomáticos e o papel da alarmina WARS durante infecções virais, buscamos neste trabalho investigar os níveis da proteína WARS intracelulares e no sobrenadante da cultura de leucócitos circulantes de pessoas vivendo com o HTLV-1.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Estudar a expressão de WARS em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) obtidas de indivíduos vivendo com HTLV-1 e em linhagens de leucemia de célula T do adulto.

4.2. Objetivos específicos

- Comparar a expressão de WARS entre as células das linhagens de leucemia T do adulto MT-2 (permanentemente infectada com HTLV-1) e Jurkat (não infectada);
- Comparar a expressão de WARS nos diferentes subtipos de linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺ (naive; memória central e memória efetora);
- Investigar se PBMCs estimuladas com peptídeo viral Tax causa a modulação da secreção de WARS;
- Correlacionar os resultados obtidos nos diferentes grupos com o estado clínico dos pacientes analisados.

5. METODOLOGIA

5.1. Cultura de células MT-2 e Jurkat

As células MT-2 são oriundas de células de leucemia de células T do adulto permanentemente infectadas com HTLV-1 e as células da linhagem Jurkat são uma linhagem de linfócitos T derivada da leucemia de células T, não infectadas por HTLV-1. As células foram cultivadas em garrafas plásticas com meio RPMI 1640 (Gibco/ThermoFisher) suplementado

com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco/ThermoFisher), com penicilina (100 UI/mL, Gibco/ThermoFisher) e estreptomicina (100 UI/mL, Gibco/ThermoFisher). As células permaneceram incubadas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e são mantidas rotineiramente através de passagens semanais.

5.2.Obtenção de amostra de pacientes com HTLV-1

As amostras de sangue total de pessoas vivendo com HTLV-1 (assintomáticos e com MAH/PET) foram fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Projeto aprovado pelo comitê de ética sob número CAAE: 46962821.1.0000.5262. Todos os indivíduos incluídos no presente estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Desta forma o estudo foi baseado nos seguintes grupos: indivíduos vivendo com HTLV-1 assintomáticos (n = 5); indivíduos vivendo com HTLV-1 portadores de MAH/PET (n = 4); indivíduos não infectados pelo HTLV-1 (n = 4) pareados em idade e sexo com os indivíduos dos demais grupos. Os pacientes foram avaliados por um neurologista e os dados foram registrados no protocolo de acompanhamento clínico utilizado pelo Centro de Referência em HTLV. Na avaliação clínica foi analisada o desenvolvimento de doença associada ao HTLV-1 e a progressão MAH/PET (escala IPEC-2). Como critério de exclusão foram excluídos do estudo indivíduos vivendo com HIV-1, HCV, HBV.

5.3.Obtenção de células mononucleadas de sangue periférico (PBMC)

Células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas de sangue de indivíduos saudáveis e indivíduos com HTLV-1, através da centrifugação com gradiente de densidade Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich/Merck) por 30 minutos a 400 g em temperatura ambiente. Após a centrifugação, o anel de células contendo PBMCs foi coletado e transferido para um novo tubo. Em seguida as células foram lavadas três vezes com PBS estéril em centrifugação a 300 g por 10 minutos. As células foram ressuspensas em SFB + 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich/Merck) e congeladas, ou com meio de cultura AIMV (Gibco/Thermo Fisher) e cultivadas (10⁶ células/poço) na presença ou ausência do peptídeo da proteína viral Tax (LLFGYPVYV; JPT Peptide Technologies GmbH) por 48h a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

5.4. Marcação intracelular da proteína WARS

As PBMCs foram descongeladas 24 h antes da marcação e cultivadas em meio RPMI 1640 + 10% de SBF a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após a contagem com Azul de Trypan, 10⁶ células viáveis foram submetidas à centrifugação a 300 g por 5 minutos em tampão de citometria (PBS + SFB 5% + Azida 0,1 % + EDTA 1 mM). O mesmo número de células Jurkat e MT2 foram utilizadas para a marcação.

As PBMCs foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos (Biolegend): anti-CD3 BV650, anti-CD4 BV785, anti-CD8 APCFire, anti-CD45RA PECy7, anti-CCR7 BV421, para fenotipagem de linfócitos T. Em seguida, foi adicionado PBS nas células, seguido de centrifugação de 300 g por 5 minutos para a lavagem, após o descarte do sobrenadante foi adicionado tampão de permeabilização.

Tanto as PBMCs quanto as células de linhagem foram incubadas na presença de uma solução fixadora e permeabilizadora (Ebioscience/ThermoFisher). Após 30 minutos a temperatura ambiente, foi adicionado tampão de permeabilização (Ebioscience/ThermoFisher) para lavagem das células, centrifugando-as a 300 g por 5 minutos. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo IgG de coelho policlonal anti-WARS (diluído 1:50, v/v, Invitrogen/ThermoFisher). Após 30 minutos em temperatura ambiente, as células foram lavadas como descrito acima. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (diluído, 1:1000, v/v) conjugado com o fluorocromo Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen/ThermoFisher). Após 20 minutos em temperatura ambiente, as células foram novamente lavadas nas mesmas condições e ressuspensas em PBS. As células foram adquiridas no citômetro de fluxo *FACSCalibur* ou *Fortessa* (BD) com aquisição de 20.000 ou 100.000 eventos, respectivamente, considerando uma região de células viáveis pelos parâmetros de tamanho e granulocidade. Para a análise da porcentagem das células e intensidade média de fluorescência foi utilizado o Software *FlowJo* 10.0.

5.5. Precipitação de proteínas

A partir de 200 µL de sobrenadante celular de PBMCs (10⁶ células/poço) de pacientes infectados pelo HTLV-1 foram coletados de células em meio de cultura AIMV (Gibco/Thermo

Fisher. Antes da coleta do sobrenadante celular das linhagens MT-2 e Jurkat, as células foram incubadas com meio sem SFB por 4 horas. Aos sobrenadantes celulares de linhagem e PBMC, foram adicionados 66 µL de Ácido Tri-cloro Acético 50%. Em seguida, a mistura foi incubada por 1h no gelo e centrifugada a 14000 rpm (Kasvi modelo K14- 4415R) por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante das amostras foi descartado e foram adicionados 500 µL de acetona 90% gelada. Após uma centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram ressuspensos no tampão de amostra para Western Blot, contendo 2% mercaptoetanol, 5% azul de bromofenol, SDS 10%, 10% Glicerol, Tris-HCl 0,5 M em H₂O MilliQ®.

5.6. Western Blot

Os extratos celulares das células MT-2 e Jurkat (2×10^6 células) foram realizados pela incubação de 80 µL de solução RIPA (250 mM Tris-HCl, 3 M NaCl, 10% NP40, 10% Desoxicolato de sódio, 250 mM EDTA em H₂O Milli Q) por 10 minutos, seguido de centrifugação de 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram ressuspensos no tampão de amostra para Western blot contendo 0,5 M Tris-Cl, 10% Glicerol, 10% SDS, 2-mercaptoetanol, 5% (p/v) azul de bromofenol em H₂O Milli Q®.

Tanto os extratos celulares quanto as proteínas precipitadas do sobrenadante foram fervidas a 100°C por 5 minutos, para posterior aplicação no gel de poliacrilamida 10% a SDS-PAGE 10%. As amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida 10% contendo no sistema tampão de corrida contendo 25 mM Trizma Base, 192 mM Glicina, 10% SDS em H₂O MilliQ®. A corrida foi feita numa corrente de 150V por 1h e 30 minutos no equipamento BioRAD Mini-PROTEAN Tetra Cell®. Em seguida, o gel de poliacrilamida com as proteínas foram montados junto com camadas de papel filtro, e a membrana de nitrocelulose num suporte de acrílico e submersas em tampão de transferência contendo 25 mM Trizma Base, 192 mM Glicina, 20% v/v de etanol em H₂O MilliQ e colocados no sistema BioRAD Mini Trans-Blot Cell® submerso numa voltagem de 100V por 1h e 20 minutos. Após o tempo da transferência a membrana de nitrocelulose contendo as proteínas foi lavada com TBS-T contendo Tris, 20 mM, NaCl 150 mM e 0,05 % Tween 20® 3 vezes por 5 minutos. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da membrana com leite desnatado 5% Molico em TBS-T. Em seguida, a membrana foi incubada em uma solução contendo os anticorpos primários anti-WARS (1:1000) ou anti-

GAPDH (1:2000; Cell Signaling, #5174), diluídos em solução TBS-T com 0,02% Azida e 3% de BSA,. Após uma incubação overnight a 4°C, foram realizadas 3 lavagens com TBS-T, para então ser feita a incubação com o anticorpo secundário (1:5000 anti-IgG de coelho) em solução TBS-T com leite em pó 5% (Molico) por 2 h. Após a última marcação, as membranas foram lavadas mais uma vez com TBS-T 3 vezes por 5 minutos e o nível de proteína foi detectado com o kit de revelação de alta sensibilidade (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate – Thermo Fisher). As membranas foram capturadas usando os equipamentos de detecção ImageQuant LAS 500 e ChemiDoc MP Imager Universal Hood III. As bandas foram quantificadas através do software ImageJ.

5.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 8.0.1. As variáveis quantitativas são avaliadas quanto à distribuição normal de valores com o teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis com dispersão normal foram avaliadas por testes paramétricos (teste t de Student), e as variáveis assimétricas foram avaliadas por testes não-paramétricos (Mann-Whitney, Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunns) e foram considerados significativos $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Expressão de WARS em células da linhagem MT-2 e Jurkat

Primeiramente, analisamos a expressão da alarmina WARS em células MT-2 através da incubação com o anticorpo anti-WARS. Após a marcação intracelular, é possível detectar que as células MT-2, infectada permanentemente com HTLV-1, expressa a alarmina WARS (**Figura 11**). Em seguida, decidimos analisar a expressão da alarmina WARS através do método de Western Blot com extrato celular da linhagem de células MT-2 e Jurkat, com a marcação do anticorpo anti-WARS, na qual é possível confirmar a presença da alarmina WARS nas células MT-2 e Jurkat (**Figura 12**).

Para avaliar se a infecção provocaria a secreção de WARS no sobrenadante das linhagens, células MT-2 e Jurkat foram cultivadas na presença de meio RPMI sem SFB por 4 h a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % CO₂. Após esse período, os sobrenadantes foram coletados e submetidos ao processo de precipitação de proteínas como descrito na metodologia.

Na figura 13 podemos observar a expressão da alarmina WARS apenas no sobrenadantes de célula MT-2, não havendo expressão no sobrenadante de células Jurkat.

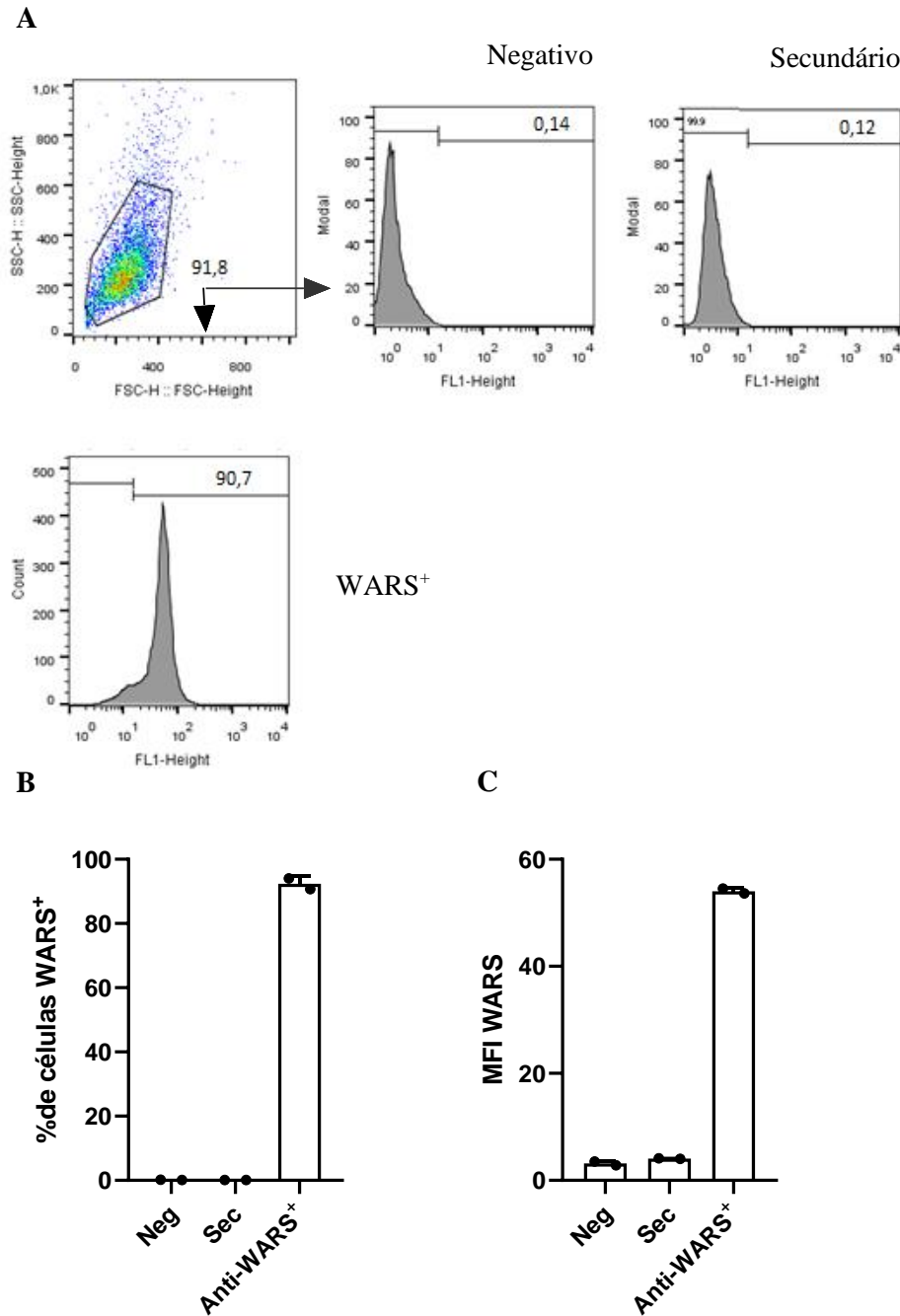


Figura 11. Alarmina WARS é expressa em linhagem de células infectadas pelo HTLV-1. As células MT-2 (5×10^5 células) foram obtidas após 3-4 dias de cultura, foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com o anticorpo IgG de coelho policlonal anti-WARS (diluído 1:50, v/v), seguido da marcação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (diluído, 1:1000, v/v) conjugado com Alexa Fluor™ 488. Cerca de 20.000 foram adquiridos no citômetro. (A) Figura representativa da estratégia de *gates*. (B) Percentual de as células WARS⁺. (C) Representação gráfica intensidade média de fluorescência (MFI).

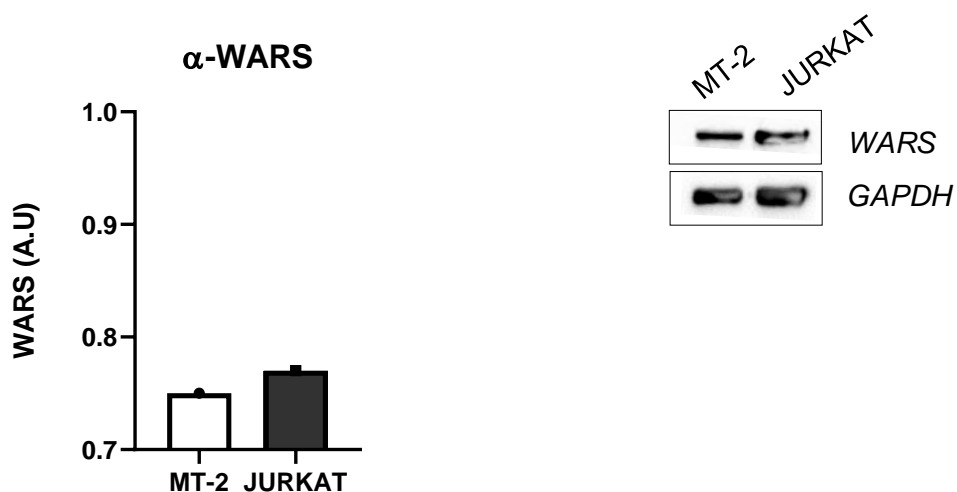


Figura 12. Alarmina WARS é expressa tanto em linhagem de células infectadas pelo HTLV-1 quanto em células Jurkat. Os extratos celulares (MT-2 e Jurkat) foram obtidos de 5×10^5 células após 3-4 dias de cultura utilizando o tampão RIPA. Os níveis da alarmina WARS foram detectados pela análise de Western Blot. Quantificação gráfica do experimento de Western Blot foi realizada pelo ImageJ e os valores foram plotados em gráficos usando o Graphpad Prism. Figura representativa do gel de 3 experimentos realizados de forma independente.

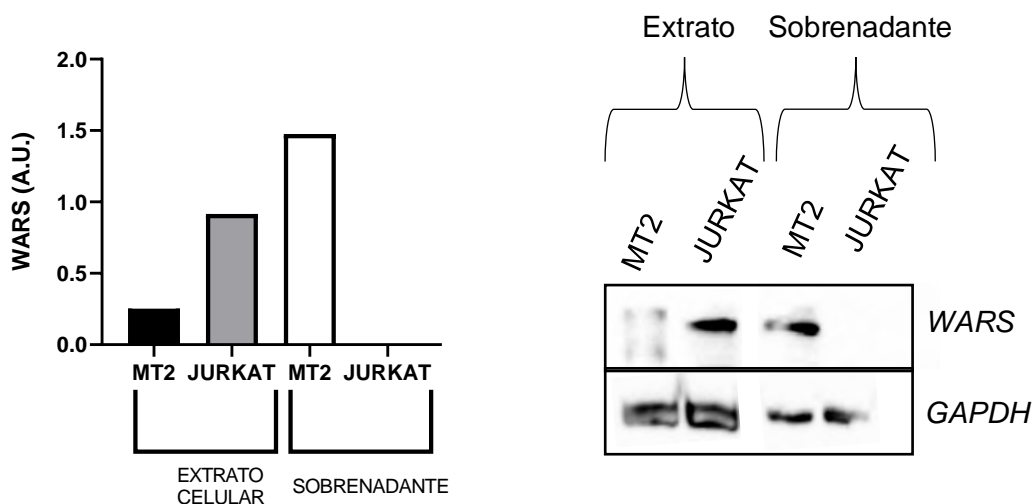


Figura 13. Presença da alarmina WARS em sobrenadante de células de linhagem. Os extratos celulares (MT-2 e Jurkat) foram obtidos de 5×10^5 células após 3-4 dias de cultura usando o tampão RIPA. Os sobrenadantes celulares (MT-2 e Jurkat) foram obtidos de 5×10^5 células após 4h de incubação de meio sem SFB. O conteúdo proteico foi adquirido pela precipitação por TCA e acetona. Os níveis da alarmina WARS foram detectados pela análise de Western Blot. Quantificação das bandas de Western Blot foi realizada pelo ImageJ e os valores foram plotados em gráficos usando o Graphpad Prism. Figura representativa do gel de 2 experimentos realizados de forma independente.

6.2 Expressão de WARS em células T CD4⁺ e CD8⁺

Inicialmente, procuramos caracterizar as populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ dentro das PBMCs obtidas de indivíduos não infectados, assintomáticos e portadores da MAH/PET. Para tal, as PBMCs foram marcadas com os anticorpos específicos para T CD4⁺ e CD8⁺, assim como os anticorpos para moléculas de superfície associadas as subpopulações de naive (CD45RA⁺CCR7⁺), de memória central (CD45RA^{neg}CCR7⁺) e de memória efetora (CD45RA^{neg/+}CCR7^{neg}) (**Figura 14**).

A frequência de células T CD4⁺ totais obtidos do PBMC de indivíduos não infectados, assintomáticos e portadores de MAH/PET não apresentou diferenças significativas. No entanto, os resultados sugerem que os indivíduos assintomáticos e portadores de MAH/PET apresentem uma menor frequência de células naive T CD4⁺ quando comparado com os indivíduos não infectados. Já para as células T CD4⁺ de memória efetora, não há uma diferença na frequência dentre os grupos. Para as células de memória central T CD4⁺ dos indivíduos assintomáticos e portadores de MAH/PET podemos detectar um pequeno aumento na frequência destas células se comparado com indivíduos não infectados (**Figura 15**).

Na figura 16, foi realizada a quantificação da frequência de células T CD8⁺ dos indivíduos não infectados, assintomáticos e portadores de MAH/PET, é possível destacar que não há uma diferença aparente na frequência total de células T CD8⁺ entre os grupos. Ao visualizar a frequência das células T CD8⁺ naive, de memória central e memória efetora, os resultados não indicam haver diferença nos grupos não infectado, assintomático e portadores de MAH/PET.

O próximo passo foi avaliar os níveis de WARS dentro de cada uma das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Os resultados das frequências de células WARS⁺ nas diferentes subpopulações de células T CD4⁺ (**Figura 17A-C**) e CD8⁺ (**Figura 18A-C**) não apresentaram diferenças entre os grupos não infectado, assintomático e portadores de MAH/PET. (**Figura 17**). Os níveis da proteína WARS nas subpopulações de células T CD4⁺, estimados pela média de intensidade de fluorescência (MFI), também não apresentaram diferenças entre os grupos (**Figura 17D-F**). No entanto, para as subpopulações de células T CD8⁺ é possível observar uma tendência de diminuição nos níveis de WARS nas células obtidas de indivíduos assintomáticos quando comparado com o nível de expressão no grupo não infectado e dos MAH/PET (**Figura 18D-F**).

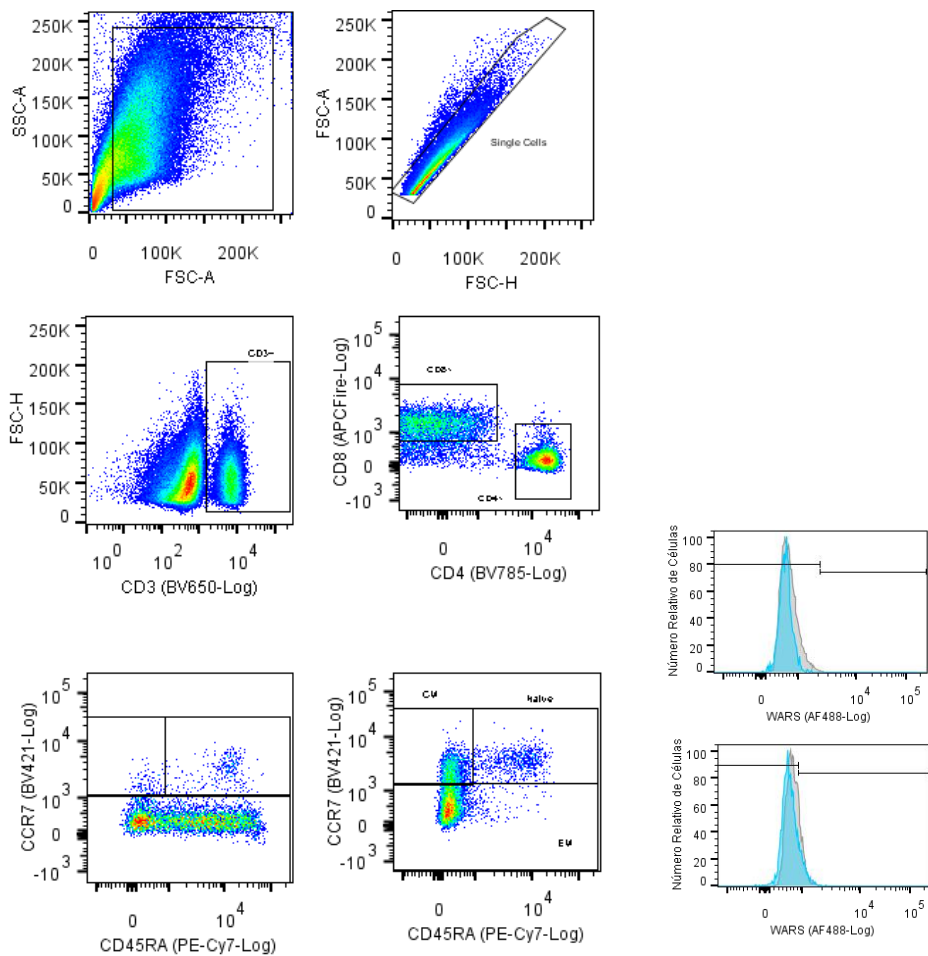


Figura 14. Citometria de fluxo de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes vivendo com HTLV-1. As células PBMC foram marcadas com anticorpos específicos contra moléculas de superfície (CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7) para definição das subpopulações. Em seguida, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo IgG de coelho policlonal anti-WARS (diluído 1:50, v/v). Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (diluído, 1:1000, v/v) conjugado com Alexa Fluor™ 488 e adquiridas no citômetro de fluxo. Estratégia de *gate* para avaliação das subpopulações celulares e das células WARS⁺.

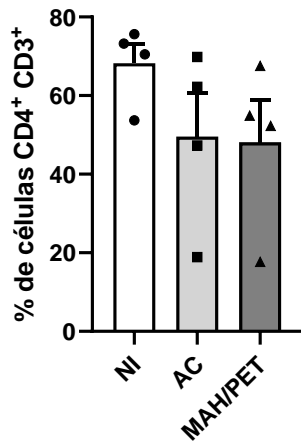
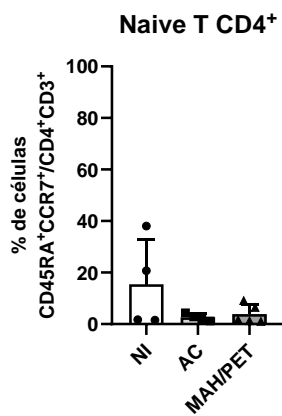
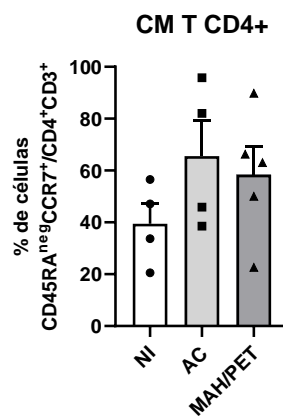
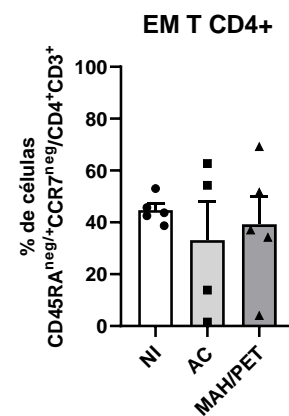
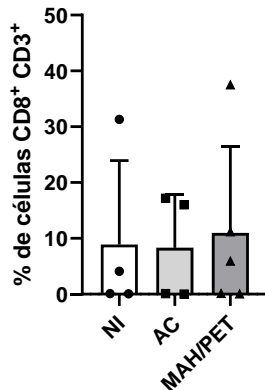
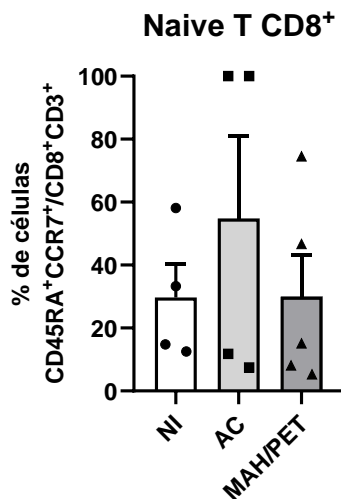
A**B****C****D**

Figura 15. Frequência de células T CD4⁺ totais, naive e de memória dentro das PBMC de pacientes vivendo com HTLV-1. As PBMCs foram descongeladas e incubadas com meio RPMI 1640 + 10% de SFB a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 24h, as células foram contadas com Azul de Trypan. As células (5x10⁵) foram centrifugadas a 300 g por 5 minutos em tampão de citometria (PBS + SFB 5% + Azida 0,1 % + EDTA 1 mM), em seguida as PBMC foram marcadas com anticorpos específicos contra moléculas de superfície (CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7) para definição das subpopulações. Em seguida, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo IgG de coelho policlonal anti-WARS (diluído 1:50, v/v). Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (diluído, 1:1000, v/v) conjugado com Alexa Fluor™ 488 e adquiridas no citômetro de fluxo. **(A)** Frequência de células T CD4⁺ em PBMC de indivíduos não infectados (NI), assintomáticos (AC) e com mielopatia (MAH/PET). **(B)** Frequência de células T de naive CD45RA⁺ CCR7⁺ em PBMC de indivíduos NI, AC e MAH/PET. **(C)** Frequência de células T de memória central CD45RA^{neg} CCR7⁺ em PBMC de indivíduos NI, AC e MAH/PET. **(D)** Frequência de células T memória efetora CD45RA^{neg/+} CCR7^{neg} em PBMC de indivíduos NI, AC e MAH/PET. Foram realizados 3 experimentos independentes e cada símbolo indica um indivíduo diferente.

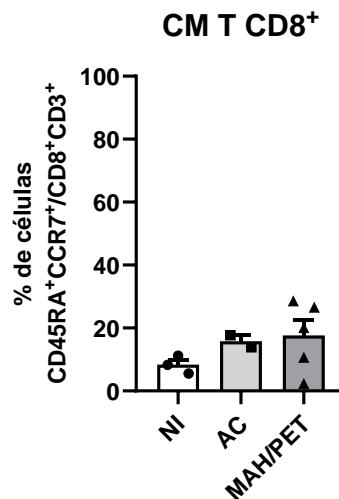
A



B



C



D

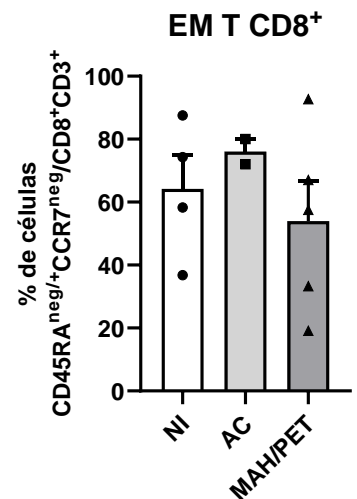


Figura 16. Frequência de células T CD8⁺ totais, naive e de memória dentro das PBMC de pacientes vivendo com HTLV-1. As PBMCs foram descongeladas e incubadas com meio RPMI 1640 + 10% de SFB a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 24h, as células foram contadas com Azul de Trypan. As células (5x10⁵) foram centrifugadas a 300 g por 5 minutos em tampão de citometria (PBS + SFB 5% + Azida 0,1 % + EDTA 1 mM), em seguida as PBMC foram marcadas com anticorpos específicos contra moléculas de superfície (CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7) para definição das subpopulações. Em seguida, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo IgG de coelho policlonal anti-WARS (diluído 1:50, v/v). Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (diluído, 1:1000, v/v) conjugado com Alexa Fluor™ 488 e adquiridas no citômetro de fluxo. **(A)** Frequência de células T CD8⁺ totais em PBMC de indivíduos não infectados (NI), assintomáticos (AC) e com mielopatia (MAH/PET). **(B)** Frequência de células T de naive CD45RA⁺ CCR7⁺ em PBMC de indivíduos NI, AC e MAH/PET. **(C)** Frequência de células T de memória central CD45RA^{neg} CCR7⁺ em PBMC de indivíduos NI, AC e MAH/PET. **(D)** Frequência de células T memória efetora CD45RA^{neg/+} CCR7^{neg} em PBMC de indivíduos NI, AC e MAH/PET. Foram realizados 2 experimentos independentes e cada símbolo indica um indivíduo diferente.

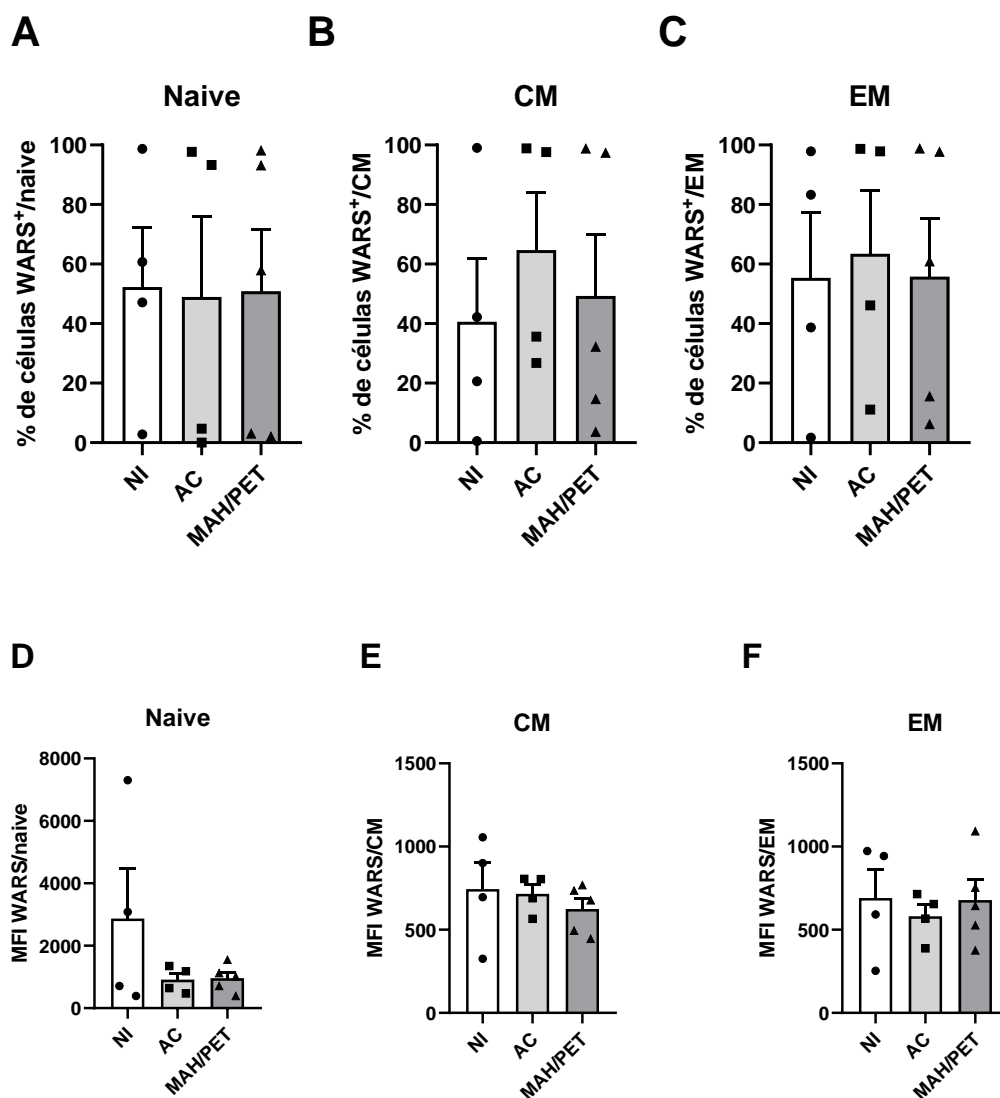


Figura 17. Alarmina WARS é expressa em linfócitos T CD4⁺ de PBMC de pacientes vivendo com HTLV-1. As PBMCs foram descongeladas e incubadas com meio RPMI 1640 + 10% de SBF a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 24h, as células foram contadas com Azul de Trypan. As células (5x10⁵) foram centrifugadas a 300 g por 5 minutos em tampão de citometria (PBS + SFB 5% + Azida 0,1 % + EDTA 1 mM), em seguida as PBMC foram marcadas com anticorpos específicos contra moléculas de superfície (CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7) para definição das subpopulações. As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo IgG de coelho policlonal anti-WARS (diluído 1:50, v/v). Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (diluído 1:1000, v/v) conjugado com Alexa Fluor™ 488 e adquiridas no citômetro de fluxo. (A-C) Frequência de células T CD4⁺ naive (CD45RA⁺ CCR7⁺/CD3⁺ CD4⁺), memória central (CM = CD45RA^{neg} CCR7⁺/CD3⁺ CD4⁺) e memória efetora (EM = CD45RA^{neg/+} CCR7^{neg}/CD3⁺ CD4⁺) positivas para a proteína WARS em PBMC de indivíduos não infectados (NI), assintomáticos (AC) e com mielopatia (MAH/PET). (D-F) Média de intensidade de fluorescência (MFI) para a proteína WARS de células T CD4⁺ naive (CD45RA⁺ CCR7⁺/CD3⁺ CD4⁺), memória central (CM = CD4⁺ CD45RA^{neg} CCR7⁺/CD3⁺ CD4⁺) e memória efetora (EM = CD45RA^{neg/+} CCR7^{neg}/CD3⁺ CD4⁺) positivas em PBMC de indivíduos NI, AC e com MAH/PET. Foram realizados 3 experimentos independentes e cada símbolo indica um indivíduo diferente.

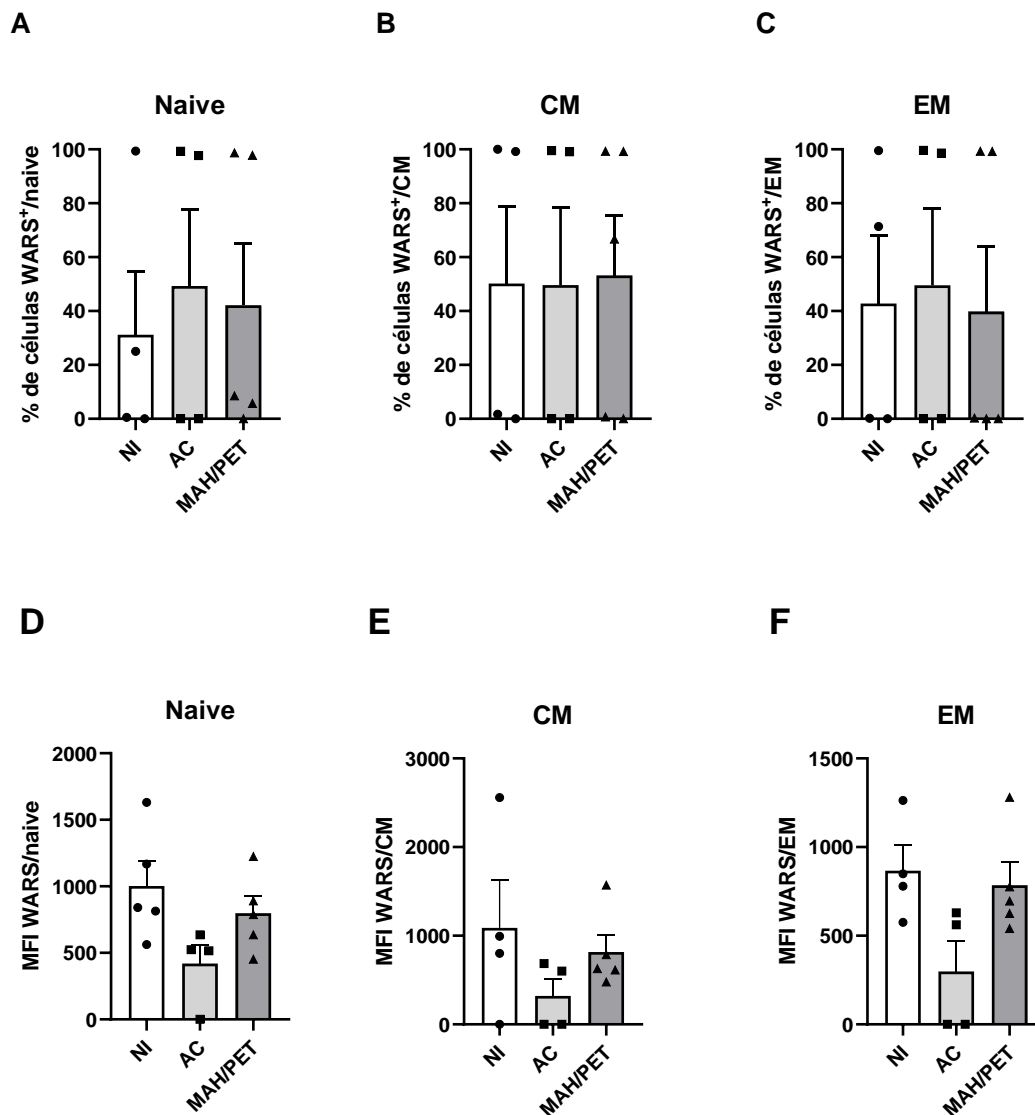


Figura 18. Alarmina WARS é expressa em linfócitos T CD8⁺ de PBMCs de pacientes vivendo com HTLV-1. As PBMCs foram descongeladas e incubadas com meio RPMI 1640 + 10% de SBF a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 24h, as células foram contadas com Azul de Trypan. As células (5x10⁵) foram centrifugadas a 300 g por 5 minutos em tampão de citometria, em seguida as PBMC foram marcadas com anticorpos específicos contra moléculas de superfície (CD3, CD4, CD8, CD45RA, CCR7) para definição das subpopulações. As células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpo IgG de coelho policlonal anti-WARS (1:50, v/v). Em seguida as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho (1:1000, v/v) conjugado com Alexa Fluor™ 488 e adquiridas no citômetro de fluxo. (A-C) Frequência de células T CD8⁺ naive (CD45RA⁺ CCR7⁺/CD3⁺ CD8⁺), memória central (CM = CD45RA^{neg} CCR7⁺/CD3⁺ CD8⁺) e memória efetora (EM = CD45RA^{neg/+} CCR7^{neg}/CD3⁺ CD8⁺) positivas para a proteína WARS em PBMC de indivíduos não infectados (NI), assintomáticos (AC) e com mielopatia (MAH/PET). (D-F) Média de intensidade de fluorescência (MFI) para a proteína WARS de células T CD8⁺ naive, memória central (CM) e memória efetora (EM) positivas em PBMC de indivíduos NI, AC e com MAH/PET. Foram realizados 2 experimentos independentes e cada símbolo indica um indivíduo diferente.

6.3. Secreção de WARS em cultura de PBMCs de pacientes infectados pelo HTLV-1

Por fim, buscamos avaliar se a proteína WARS poderia ser secretada por PBMCs de indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e mielopatas, após serem estimuladas *in vitro* com o peptídeo da proteína viral Tax. Na figura 19 observamos o resultado de um experimento preliminar no qual a alarmina WARS foi encontrada no sobrenadante de PBMCs obtidas de indivíduos infectados com HTLV-1 e estimulados com o peptídeo da proteína viral Tax, quando comparados os sobrenadantes de PBMCs não estimulados.

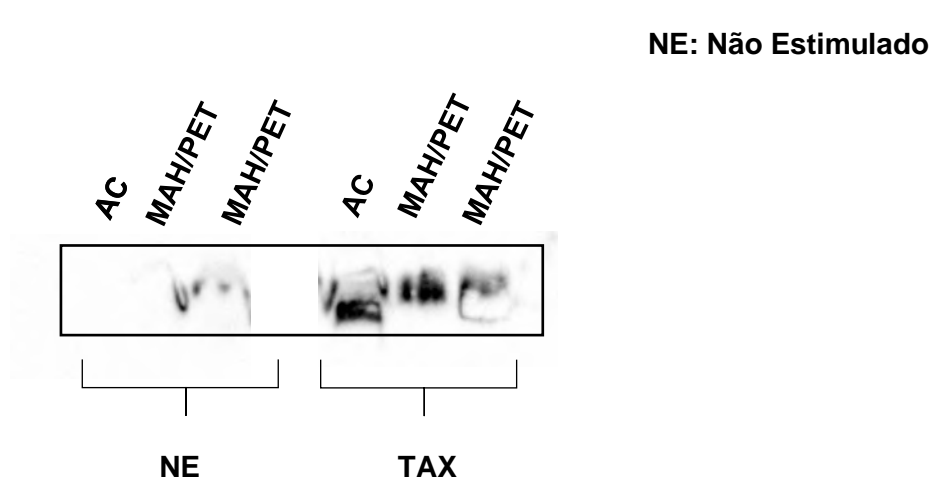


Figura 19. Alarmina WARS é encontrada em sobrenadante de PBMC de pacientes vivendo com HTLV-1. O conteúdo proteico foi adquirido pela precipitação por TCA e acetona. Os níveis da alarmina WARS no sobrenadante de células PBMCs incubados por 40h com meio AIMV com ou sem o peptídeo viral TAX, detectado pelo ensaio de Western Blot. A quantificação da imagem das bandas da membrana do experimento de Western Blot foi realizada através de análise pelos softwares ImageJ. Figura representativa do gel de 2 experimentos realizados de forma independente.

7. DISCUSSÃO

A alarmina WARS, já foi descrita na literatura em contextos infecciosos, podendo assumir uma função na modulação da resposta imune contra patógenos (Ahn *et al.*, 2016). Além disso, a WARS pode ser associada a ativação celular em contextos de células com degradação de triptofano induzida por interferons (Boasso *et al.*, 2005). Em linhagem de células THP-1 infectadas com o vírus sincicial respiratório (VSR), é detectada a secreção da alarmina WARS no estágio inicial(4-6h) de infecção (Lee *et al.*, 2019). Níveis altos de WARS está também associado a um aumento de gravidade e infectividade do vírus SARS-Cov-2, sendo uma molécula importante para determinar o prognóstico de evolução da doença em pacientes infectados (Maras *et al.*, 2021). Além disso, em neuropatias motores hereditárias distais, a expressão da alarmina WARS, contendo mutações na porção His257Arg, inibe o crescimento neuronal e leva a degeneração neuronal em linhagem celular e em camundongos (Tsai *et al.*, 2017).

O presente estudo demonstrou que a alarmina WARS é expressa no extrato celular e pode ser encontrada no sobrenadante de células MT-2 (células infectadas por HTLV-1). No entanto, não foi encontrada no sobrenadante das células Jurkat (células não infectadas por HTLV-1), sugerindo que a infecção promove secreção da proteína. Além disso, a proteína também pode ser detectada no sobrenadante de PBMCs estimuladas com a um peptídeo da proteína viral Tax.

Estudos demonstraram que em resposta a estímulo de ATP, LPS ou Ca^{2+} , a alarmina WARS também pode ser secretada através da interação com calpaína 2 por vesículas derivadas da membrana plasmática *in vivo e in vitro* (Nguyen *et al.*, 2023).

Em células T CD4⁺, a alarmina WARS associada aIDO (indoleamina 2,3-dioxigenase), que é uma molécula ligada ao metabolismo de triptofano, está associada a regulação da resposta imune induzida por interferon (Boasso *et al.*, 2005). Ao estudar a proteína WARS em células T CD4⁺ e T CD8⁺ em suas subpopulações (naive, memória central, memória efetora) obtidas de indivíduos não infectados, assintomáticos e portadores de MAH/PET observamos uma tendência de redução dos níveis da proteína nas células T CD8⁺ de indivíduos assintomáticos. Embora preliminares os resultados podem indicar que a redução dos níveis de WARS esteja associada com o processo de secreção da molécula. Além disso, a relação de redução nas células obtidas de indivíduos assintomáticos pode estar relacionada a um controle de carga pró-viral destes indivíduos comparada a carga pró-viral dos pacientes estudados com MAH/PET (valores

da carga pró-viral: AC=0,61±0,28% e MAH/PET 2,10±0,52% - Dados obtidos dos prontuários dos pacientes do INI - FIOCRUZ).

8. CONCLUSÃO

Podemos sugerir que a alarmina WARS pode ser modulada durante a infecção causada pelo HTLV-1, pois há a presença da WARS em células de linhagem MT-2 e no seu sobrenadante.

Linfócitos T CD8⁺ obtidas de indivíduos assintomáticos parecem apresentar níveis reduzidos da proteína WARS.

Células mononucleares de sangue periférico de pacientes infectados pelo HTLV-1 são capazes de secretar WARS após um estímulo com peptídeo derivado de proteína viral.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso, P.V., Cassar, O. & Gessain, A. Molecular epidemiology, genetic variability and evolution of HTLV-1 with special emphasis on African genotypes. *Retrovirology* 16, 39 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0504-z>

Ahmadi Ghezeldasht, S., Shamsian, S. A. A., Gholizadeh Navashenaq, J., Miri, R., Ashrafi, F., Mosavat, A., & Rezaee, S. A. (2021). HTLV-1 oncovirus-host interactions: From entry to the manifestation of associated diseases. *Reviews in medical virology*, 31(6), e2235.

Ahn, Y., Park, S., Choi, J. *et al.* Secreted tryptophanyl-tRNA synthetase as a primary defence system against infection. *Nat Microbiol* 2, 16191 (2016).

Albrecht B., Collins N. D., Burniston M. T., Nisbet J. W., Ratner L., Green P. L., Lairmore M. D. (2000). Human T-lymphotropic virus type 1 open reading frame I p12(I) is required for efficient viral infectivity in primary lymphocytes. *J. Virol.* 74, 9828–9835

Albrecht B, Lairmore MD. Critical role of human T-lymphotropic virus type 1 accessory proteins in viral replication and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002 Sep;66(3):396-406, table of contents. doi: 10.1128/MMBR.66.3.396-406.2002. PMID: 12208996; PMCID: PMC120794.

Arnold, J., Yamamoto, B., Li, M., Phipps, A. J., Younis, I., Lairmore, M. D., & Green, P. L. (2006). Enhancement of infectivity and persistence in vivo by HBZ, a natural antisense coded protein of HTLV-1. *Blood*, 107(10), 3976–3982. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-11-4551>

Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, *et al.* (2003) Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2610–2615.

Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev.* (1971) Sep;35(3):235-41.

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 CR, Araujo A, Yamano Y, Taylor GP. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nat Rev Dis Primers.* 2015 Jun 18; 1:15012. doi: 10.1038/nrdp.2015.12. PMID: 27188208.

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.

Biswas HH, Engstrom JW, Kaidarova Z, Garratty G, Gible JW, Newman BH, Smith JW, Ziman A, Friley JL, Sacher RA, Murphy EL. Neurologic abnormalities in HTLV-I- and HTLV-II-infected individuals without overt myelopathy. *Neurology.* 2009 Sep 8;73(10):781-9. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181b6bba9. PMID: 19738173; PMCID: PMC2739606.

Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, Winkler C, Shearer GM. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells. *Blood.* 2005 Feb 15;105(4):1574-81. doi: 10.1182/blood-2004-06-2089. Epub 2004 Oct 5. PMID: 15466932.

Brites, Carlos *et al.* Pathogenesis of HTLV-1 infection and progression biomarkers: An overview. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 25, n. 3, 2021.

Cachat, A. *et al.* Alpha interferon restricts human T-lymphotropic virus type 1 and 2 de novo infection through PKR activation. *J. Virol.* 87, 13386–13396 (2013).

Carpentier, A., Barez, P. Y., Hamaidia, M., Gazon, H., de Brogniez, A., Perike, S., Gillet, N., & Willems, L. (2015). Modes of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Transmission, Replication and Persistence. *Viruses*, 7(7), 3603–3624. <https://doi.org/10.3390/v7072793>

Carter, John., Saunders, Venetia. (2007). *Virology Principles and Applications.*, eds. 1. ed. (England: John Wiley e Sons), pp. 186.

Catalan-Soares, Bernadette, Carneiro-Proietti, Anna Bárbara de F. and Proietti, Fernando Augusto 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* [online]. 2005, v. 21, n. 3, pp. 926-931.

Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti ABF, Proietti FA. Human T-cell lymphotropic viruses type I and II (HTLV-I/II) in blood donors in Minas Gerais, Brasil: determinants associated with seropositivity in a low-risk population. *Rev Saúde Pública* 2003; 37:470-6.

Cho I, Sugimoto M, Mita S, Tokunaga M, Imamura F, Ando M. In vivo proviral burden and viral RNA expression in T cell subsets of patients with human T lymphotropic virus type-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Am J Trop Med Hyg.* 1995 Oct;53(4):412-8. doi: 10.4269/ajtmh.1995.53.412. PMID: 7485696.

Cavrois M, Gessain A, Gout O, Wain-Hobson S, Wattel E. Common human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) integration sites in cerebrospinal fluid and blood lymphocytes of patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis indicate that HTLV-1 crosses the blood-brain barrier via clonal HTLV-1-infected cells. *J Infect Dis.* 2000 Oct;182(4):1044-50. doi: 10.1086/315844. Epub 2000 Sep 6. PMID: 10979898.

Cruz, B., B. Catalan-Soares, and F. A. Proietti. 2006. Higher prevalence of fibromyalgia in patients infected with human T cell lymphotropic virus type I. *J. Rheumatol.* 33:2300–2303.

Cook, L. B., Melamed, A., Niederer, H., Valganon, M., Laydon, D., Foroni, L., Taylor, G. P., Matsuoka, M., & Bangham, C. R. (2014). The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 123(25), 3925–3931

de Castro-Amarante MF, Pise-Masison CA, McKinnon K, Washington Parks R, Galli V, Omsland M, Andresen V, Massoud R, Brunetto G, Caruso B, Venzon D, Jacobson S, Franchini G. Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Infection of the Three Monocyte Subsets Contributes to Viral Burden in Humans. *J Virol.* 2015 Nov 25;90(5):2195-207. doi: 10.1128/JVI.02735-15. PMID: 26608313; PMCID: PMC4810698.

Ding W, Albrecht B, Luo R, Zhang W, Stanley JR, Newbound GC, Lairmore MD. Endoplasmic reticulum and cis-Golgi localization of human T-lymphotropic virus type 1 p12(I): association with calreticulin and calnexin. *J Virol.* 2001 Aug;75(16):7672-82. doi: 10.1128/JVI.75.16.7672-7682.2001. PMID: 11462039; PMCID: PMC115002.

Echevarria-Lima J, de Abreu Pereira D, de Oliveira TS, de Melo Espíndola O, Lima MA, Celestino Leite AC, Sandim V, Rodrigues Nascimento C, E Kalume D, B Zingali R. Protein Profile of Blood Monocytes is Altered in HTLV-1 Infected Patients: Implications for HAM/TSP Disease. *Sci Rep.* 2018 Sep 25;8(1):14354. doi: 10.1038/s41598-018-32324-2. PMID: 30254298; PMCID: PMC6156329.

Edwards, D., Fenizia, C., Gold, H., de Castro-Amarante, M. F., Buchmann, C., Pise-Masison, C. A., & Franchini, G. (2011). Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. *Viruses*, 3(6), 861–885.

Emamian ES, Leon JM, Lessard CJ, Grandits M, Baechler EC, *et al.* (2009) Peripheral blood gene expression profiling in Sjogren's syndrome. *Genes Immun* 10: 285–296.

Enose-Akahata, Y., Matsuura, E., Tanaka, Y., Oh, U., e Jacobson, S. (2012). Minocycline modulates antigenspecific CTL activity through inactivation of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I associated neurologic disease. *Retrovirology*, 9, 16.

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., Poiesz B. J. (1992). Infection of peripheral blood mononuclear cells and cell lines by cell-free human T-cell lymphoma/leukemia virus type I. *J. Clin. Microbiol.* 30 905–910

Fogarty KH, Zhang W, Grigsby IF, *et al.* new insights into HTLV-1 particle structure, assembly, and Gag-Gag interactions in living cells. *Viruses.* 2011; 3:770-93.

Foell D, Wittkowski H, Roth J. Mechanisms of disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2007 Jul

Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood.* 1995; 86:3619–3639.

Gallo, 2005 Gallo R. C. (2005). The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology,* 2, 17.

Gaudray, G., Gachon, F., Basbous, J., Biard-Piechaczyk, M., Devaux, C., & Mesnard, J. M. (2002). The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *Journal of virology,* 76(24)

Gessain, A., & Cassar, O. (2012). Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Frontiers in microbiology,* 3, 388.

Gessain A, Mahieux R. Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. *Rev Neurol (Paris).* 2012 Mar;168(3):257-69. doi: 10.1016/j.neurol.2011.12.006. Epub 2012 Mar 7. PMID: 22405461.

Ghez D., Lepelletier Y., Lambert S., Fourneau J. M., Blot V., Janvier S., *et al.* (2006). Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J. Virol.* 80 6844–6854

Gillet NA, Malani N, Melamed A, Gormley N, Carter R, Bentley D, Berry C, Bushman FD, Taylor GP, Bangham CR. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. *Blood.* 2011 Mar 17;117(11):3113-22.

Goon PK, Hanon E, Igakura T, Tanaka Y, Weber JN, Taylor GP, Bangham CR. High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Blood.* 2002 May 1;99(9):3335-41. doi: 10.1182/blood.v99.9.3335. PMID: 11964301.

Goon, P. K. *et al.* Human T cell lymphotropic virus (HTLV) type-1-specific CD8+ T cells: frequency and immunodominance hierarchy. *J. Infect. Dis.* 189, 2294–2298 (2004)

Hanon, E. *et al.* High production of interferon γ but not interleukin-2 by human T-lymphotropic virus type I-infected peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 98, 721–726 (2001).

Hayashi D, Kubota R, Takenouchi N, Tanaka Y, Hirano R, Takashima H, Osame M, Izumo S, Arimura K. Reduced Foxp3 expression with increased cytomegalovirus-specific CTL in HTLV-I-associated myelopathy. *J*

- Neuroimmunol. 2008 Aug 30;200(1-2):115-24. doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.06.005. Epub 2008 Jul 18. PMID: 18639344.
- Hidaka M, Inoue J, Yoshida M, Seiki M. Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *EMBO J.* 1988 Feb;7(2):519-23. doi: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb02840.x. PMID: 2835230; PMCID: PMC454349.
- Hino S. (2011). Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL prevention program Nagasaki. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 87, 152–166 10.2183/pjab.87.152
- Hino, S., Yamaguchi, K., Katamine, S., Sugiyama, H., Amagasaki, T., Kinoshita, K., *et al.* (1985). Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia virus type-I. *Jpn. J. Cancer Res.* 76, 474–480.
- Hinuma, K Nagata, M Hanaoka, *et al.* Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78 (1981), pp. 6476-6480
- Hiscott, J., Kwon, H., & Génin, P. (2001). Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *The Journal of clinical investigation*, 107(2), 143–151.
- Hishizawa M, Imada K, Kitawaki T, Ueda M, Kadowaki N, Uchiyama T. Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals. *Br J Haematol.* 2004 Jun;125(5):568-75. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.04956.x. PMID: 15147371.
- Huang, W., Eum, S. Y., Andrés, I. E., Hennig, B., e Toborek, M. (2009). PPAR α and PPAR γ attenuate HIV-induced dysregulation of tight junction proteins by modulations of matrix metalloproteinase and proteasome activities. *The FASEB Journal*, 23, 1596-1606
- 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.
- 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.
- Izumo S. Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP): The 50th Anniversary of Japanese Society of Neuropathology. *Neuropathology.* 2010 Oct;30(5):480-5. doi: 10.1111/j.1440-1789.2010.01135.x. PMID: 20573027.
- Jin, M. Unique roles of tryptophanyl-tRNA synthetase in immune control and its therapeutic implications. *Exp Mol Med* 51, 1–10 (2019).

- Johnson JM, Harrod R, Franchini G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *Int J Exp Pathol*. 2001 Jun;82(3):135-47. doi: 10.1046/j.1365-2613.2001.00191. x.
- Jones K. S., Lambert S., Bouttier M., Benit L., Ruscetti F. W., Hermine O., *et al.* (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., Ruscetti F. W. (2005). Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4⁺ T cells. *J. Virol*. 79 12692–12702
- Journo C, Mahieux R. HTLV-1 and innate immunity. *Viruses*. 2011 Aug;3(8):1374-94. doi: 10.3390/v3081374. Epub 2011 Aug 8.
- Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*. 1982 Nov 5;218(4572):571-3.
- Kannagi, M., Hasegawa, A., Takamori, A., Kinpara, S. & Utsunomiya, A. The roles of acquired and innate immunity in human T-cell leukemia virus type 1-mediated diseases. *Front. Microbiol*. 3, 323 (2012).
- Kannagi, M. *et al.* Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8⁺ cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells. *Int. Immunol*. 3, 761–767 (1991)
- Kaplan J. E., Khabbaz R. F., Murphy E. L., Hermansen S., Roberts C., Lal R., *et al.* (1996). Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. The Retrovirus Epidemiology Donor Study Group. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol*. 12, 193–201
- Krause, S. W. *et al.* Differential screening identifies genetic markers of monocyte to macrophage maturation. *J. Leukoc. Biol*. 60, 540–545 (1996).
- Kinpara, S. *et al.* Stromal cell-mediated suppression of human T-cell leukemia virus type 1 expression in vitro and in vivo by type I interferon. *J. Virol*. 83, 5101–5108 (2009).
- Koralnik I, Gessain A, Klotman ME, *et al.* Protein isoforms encoded by the pX region of the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992a; 89:8813–8817.
- Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira J, Iwamasa T, Goto I, Yamamoto N. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*. 1993 Sep;196(1):25-33. doi: 10.1006/viro.1993.1451. PMID: 8356797.
- Lambert S., Bouttier M., Vassy R., Seigneuret M., Petrow-Sadowski C., Janvier S., *et al.* (2009). HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood* 113 5176–5185
- LeBreton M, Switzer WM, Djoko CF, Gillis A, Jia H, Sturgeon MM, Shankar A, Zheng H, Nkeunen G, Tamoufe U, Nana A, Le Doux Doffo J, Tafon B, Kiyang J, Schneider BS, Burke DS, Wolfe ND. A gorilla reservoir for

human T-lymphotropic virus type 4. *Emerg Microbes Infect.* 2014 Jan;3(1):e7. doi: 10.1038/emi.2014.7. Epub 2014 Jan 22.

Lee HC, Lee ES, Uddin MB, Kim TH, Kim JH, Chaturanga K, Chaturanga WAG, Jin M, Kim S, Kim CJ, Lee JS. Released Tryptophanyl-tRNA Synthetase Stimulates Innate Immune Responses against Viral Infection. *J Virol.* 2019 Jan 4

Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* 2018 Jan 4

Leite AC, Silva MT, Alamy AH, Afonso CR, Lima MA, Andrada-Serpa MJ, Nascimento OJ, Araújo AQ. Peripheral neuropathy in HTLV-I infected individuals without tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy. *J Neurol.* 2004 Jul;251(7):877-81. doi: 10.1007/s00415-004-0455-7. PMID: 15258793.

Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, Devera ME, Liang X, Tör M, Billiar T. The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev.* 2007 Dec; 220:60-81.

Makino M, Wakamatsu S, Shimokubo S, Arima N, Baba M. Production of functionally deficient dendritic cells from HTLV-I-infected monocytes: implications for the dendritic cell defect in adult T cell leukemia. *Virology.* 2000 Aug 15;274(1):140-8. doi: 10.1006/viro.2000.0445. PMID: 10936095.

Maras JS, Sharma S, Bhat A, Rooge S, Aggrawal R, Gupta E, Sarin SK. Multi-omics analysis of respiratory specimen characterizes baseline molecular determinants associated with SARS-CoV-2 outcome. *iScience.* 2021 Aug 20;24(8):102823

Martin JL, Maldonado JO, Mueller JD, Zhang W, Mansky LM. Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. *Viruses.* 2016 Jan 27;8(2):31.

Manel N., Kim F. J., Kinet S., Taylor N., Sitbon M., Battini J. L. (2003). The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* 115 449–459

Manns A., Miley W. J., Wilks R. J., Morgan O. S., Hanchard B., Wharfe G., *et al.* (1999). Quantitative proviral DNA and antibody levels in the natural history of HTLV-I infection. *J. Infect. Dis.* 180 1487–1493

Matsunaga, T. *et al.* Analysis of gene expression during maturation of immature dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Scand. J. Immunol.* 56, 593–601 (2002). 62.

Matsuoka, M., & Jeang, K. T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature reviews. Cancer,* 7(4), 270–280.

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

Mori, K., M. Noguchi, M. Matsuo, K. Nomata, T. Nakamura, and H. Kanetake. 2004. Natural course of voiding function in patients with human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy. *J. Neurol. Sci.* 217:

- Murphy E. L., Figueroa J. P., Gibbs W. N., Holding-Cobham M., Cranston B., Malley K., *et al.* (1991). Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. *Am. J. Epidemiol.* 133, 1114–112
- Moritoyo T, Izumo S, Moritoyo H, Tanaka Y, Kiyomatsu Y, Nagai M, Usuku K, Sorimachi M, Osame M. Detection of human T-lymphotropic virus type I p40tax protein in cerebrospinal fluid cells from patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol.* 1999 Jun;5(3):241-8. doi: 10.3109/13550289909015810. PMID: 10414514.
- 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.
- Nagai M, Jacobson S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Curr Opin Neurol.* 2001 Jun;14(3):381-6. doi: 10.1097/00019052-200106000-00019. PMID: 11371764.
- Nagai M, Osame M. Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological diseases. *J Neurovirol.* 2003 Apr;9(2):228-35. doi: 10.1080/13550280390194028. PMID: 12707853.
- Narikawa K, Fujihara K, Misu T, Feng J, Fujimori J, Nakashima I, Miyazawa I, Saito H, Sato S, Itoyama Y. CSF-chemokines in HTLV-I-associated myelopathy: CXCL10 up-regulation and therapeutic effect of interferon-alpha. *J Neuroimmunol.* 2005 Feb;159(1-2):177-82. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.10.011. Epub 2004 Dec 15. PMID: 15652417.
- Nascimento CR, Lima MA, de Andrada Serpa MJ, Espindola O, Leite AC, Echevarria-Lima J. Monocytes from HTLV-1-infected patients are unable to fully mature into dendritic cells. *Blood.* 2011 Jan 13;117(2):489-99. doi: 10.1182/blood-2010-03-272690. Epub 2010 Oct 18. PMID: 20956799.
- Nejmeddine, M., & Bangham, C. R. M. (2010). The HTLV-1 Virological Synapse. *Viruses*, 2(7), 1427–1447.
- 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.
- Nguyen TTT, Choi YH, Lee WK, Ji Y, Chun E, Kim YH, Lee JE, Jung HS, Suh JH, Kim S, Jin M. Tryptophan-dependent and -independent secretions of tryptophanyl- tRNA synthetase mediate innate inflammatory responses. *Cell Rep.* 2023 Jan 31;42(1):111905. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111905. Epub 2022 Dec 30. PMID: 36640342.
- Okochi K., Sato H., Hinuma Y. (1984). A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang.* 46, 245–253
- 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.

Oliveira, P., N. M. de Castro, and E. M. Carvalho. 2007. Urinary and sexual manifestations of patients infected by HTLV-I. *Clinics* 62:191–196.

Pais-Correia, A. M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., Gout, O., Alcover, A., & Thoulouze, M. I. (2010). Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nature medicine*, 16(1), 83–89.

Pique C, Jones KS. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front Microbiol.* 2012 Oct 24; 3:378.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980

Randall RE, Goodbourn S (2008) Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 89: 1–47.

Richardson JH, Edwards AJ, Cruickshank JK, Rudge P, Dalgleish AG. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol.* 1990 Nov;64(11):5682-7. doi: 10.1128/JVI.64.11.5682-5687.1990. PMID: 1976827; PMCID: PMC248630.

Sajish, M. *et al.* Trp-tRNA synthetase bridges DNA-PKcs to PARP-1 to link IFN γ and p53 signaling. *Nat. Chem. Biol.* 8, 547–554 (2012).

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.

Sanchez-Palacios C., Gotuzzo E., Vandamme A. M., Maldonado Y. (2003). Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I) infection among ethnically and geographically diverse Peruvian women. *Int. J. Infect. Dis.* 7, 132–137

Satou, Y., Yasunaga, J., Yoshida, M., & Matsuoka, M. (2006). HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 720–725. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507631103>

Satou Y, Yasunaga Ji, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, *et al.* (2011) HTLV-1 bZIP Factor Induces T-Cell Lymphoma and Systemic Inflammation In Vivo. *PLOS Pathogens* 7(2): e1001274. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001274>

Schreiber G. B., Murphy E. L., Horton J. A., Wright D. J., Garfein R., Chien H. C., *et al.* (1997). Risk factors for human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I and -II) in blood donors: the retrovirus epidemiology donor study. NHLBI retrovirus epidemiology donor study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 14, 263–271

Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, *et al.* Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sci U S A. 1983

Silva MT, Mattos P, Alfano A, Araújo AQ. Neuropsychological assessment in HTLV-1 infection: a comparative study among TSP/HAM, asymptomatic carriers, and healthy controls. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2003 Aug;74(8):1085-9. doi: 10.1136/jnnp.74.8.1085. PMID: 12876239; PMCID: PMC1738599.

Silva MT, Harab RC, Leite AC, Schor D, Araújo A, Andrada-Serpa MJ. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load in asymptomatic carriers, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, and other neurological abnormalities associated with HTLV-1 infection. *Clin Infect Dis*. 2007 Mar 1;44(5):689-92. doi: 10.1086/510679. Epub 2007 Jan 22. PMID: 17278060.

Souza FDS, Freitas NL, Gomes YCP, , Torres RC, Echevarria-Lima J, Leite ACCB, Lima MASD, Araújo AQC, Silva MTT, Espíndola OM. Lessons from the Cerebrospinal Fluid Analysis of HTLV-1-Infected Individuals: Biomarkers of Inflammation for HAM/TSP Development. *Viruses*. 2022 Sep 29;14(10):2146. doi: 10.3390/v14102146. PMID: 36298702; PMCID: PMC9609689.

Stumpf, B. P., A. B. Carneiro-Proietti, F. A. Proietti, F. L. Rocha, and the Interdisciplinary HTLV Research Group. 2008. Higher rate of major depression among blood donor candidates infected with human T-cell lymphotropic virus type 1. *Int. J. Psychiatry Med*

Tangy, F. (1996) *Molecular Biology of HTLV-1. HTLV-1, truths and questions*. Colombia, Cali, Feriva Editores, 1-13

Tattermusch, S. *et al*. Systems biology approaches reveal a specific IFN-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. *PLoS Pathog*. 8, e1002480 (2012)

Tsai PC, Soong BW, Mademan I, Huang YH, Liu CR, Hsiao CT, Wu HT, Liu TT, Liu YT, Tseng YT, Lin KP, Yang UC, Chung KW, Choi BO, Nicholson GA, Kennerson ML, Chan CC, De Jonghe P, Cheng TH, Liao YC, Züchner S, Baets J, Lee YC. A recurrent WARS mutation is a novel cause of autosomal dominant distal hereditary motor neuropathy. *Brain*. 2017 May 1;140(5):1252-1266.

Tsukasaki, K., Hermine, O., Bazarbachi, A., Ratner, L., Ramos, J. C., Harrington, W., Jr, O'Mahony, D., Janik, J. E., Bittencourt, A. L., Taylor, G. P., Yamaguchi, K., Utsunomiya, A., Tobinai, K., & Watanabe, T. (2009). Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(3), 453–459.

Tzima, E. & Schimmel, P. Inhibition of tumor angiogenesis by a natural fragment of a tRNA synthetase. *Trends Biochem. Sci*. 31, 7–10 (2006).

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

- Umehara F, Izumo S, Takeya M, Takahashi K, Sato E, Osame M. Expression of adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1) in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *Acta Neuropathol.* 1996;91(4):343-50. doi: 10.1007/s004010050435. PMID: 8928610.
- Valeri VW, Hryniewicz A, Andresen V, Jones K, Fenizia C, Bialuk I, Chung HK, Fukumoto R, Parks RW, Ferrari MG, Nicot C, Cecchinato V, Ruscetti F, Franchini G. Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. *Blood.* 2010 Nov 11;116(19):3809-17. doi: 10.1182/blood-2010-05-284141. Epub 2010 Jul 20. PMID: 20647569; PMCID: PMC2981536.
- Van Prooyen N, Gold H, Andresen V, Schwartz O, Jones K, Ruscetti F, Lockett S, Gudla P, Venzon D, Franchini G. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 30;107(48):20738-43.
- Van der Pouw Kraan TC, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Voskuyl AE, Rustenburg F, *et al.* (2007) Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis* 66: 1008–1014.
- VF da Silva Lima *et al.*, (2021). Vírus Linfotrópicos de células T humanas (HTLV-1 e HTLV-2): revisão de literatura / Human T-cell lymphotropic viruses (HTLV-1 and HTLV-2): literature review. *Brazilian Journals Publicações de Periódicos, São José dos Pinhais, Paraná*
- Wakasugi K, Yokosawa T, Sato A, Tryptophan Depletion Modulates Tryptophanyl-tRNA Synthetase-Mediated High-Affinity Tryptophan Uptake into Human Cells. *Genes (Basel).* 2020 Nov 27;11(12):1423. doi: 10.3390/genes11121423. PMID: 33261077; PMCID: PMC7760169.
- Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R. H. & Chisari, F. V. Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 6669–6674 (2004). 65. Zhu, H., Cong, J. P., Mamtora, G., Gingeras, T. & Shenk, T. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14470–14475 (1998).
- Yao, J., & Wigdahl, B. (2000). Human T cell lymphotropic virus type I genomic expression and impact on intracellular signaling pathways during neurodegenerative disease and leukemia. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 5, D138–D168.
- 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 , Matsuura E , , Jacobson S. Neuroimmunity of HTLV-I Infection. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010 Sep;5(3):310-25. doi: 10.1007/s11481-010-9216-9. Epub 2010 May 2. PMID: 20437106; PMCID: PMC4765956.
- 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.

Yoshida M. Molecular approach to human leukemia: isolation and characterization of the first human retrovirus HTLV-1 and its impact on tumorigenesis in adult T-cell leukemia. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2010;86(2):117-30. doi: 10.2183/pjab.86.117. PMID: 20154469; PMCID: PMC3417562.

Zhi H, *et al.* 2011. NF-kappaB hyperactivation by HTLV-1 Tax induces cellular senescence but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS Pathog.* 7:e1002025 doi:10.1371/journal.ppat.1002025