

Juliana Pinheiro dos Santos Abreu

Avaliação da resposta antimicrobiana de pessoas vivendo com HTLV-1 contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* multirresistente.



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

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

Dezembro / 2023

**Trabalho a ser 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

P654a PINHEIRO DOS SANTOS ABREU, JULIANA  
Avaliação da resposta antimicrobiana de pessoas  
vivendo com HTLV-1 contra Escherichia coli e  
Staphylococcus aureus multirresistente. / JULIANA  
PINHEIRO DOS SANTOS ABREU. -- Rio de Janeiro, 2023.  
84 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. Infecções bacterianas oportunistas.  
3. Imunoglobulinas. 4. Opsonofagocitose. I.  
Echevarria Lima, Juliana, orient. II. Título.

**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(A): Juliana Pinheiro dos Santos Abreu      DRE: 120047659**

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof. Alberto Félix da Nóbrega (Presidente)  
 Prof. Anderson Guimarães  
 Prof. Raquel Soares Casacs  
 Prof. Dennis Carvalho Ferreira (Suplente)

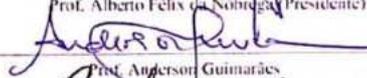
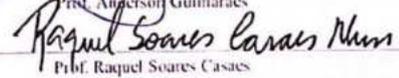
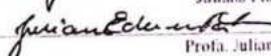
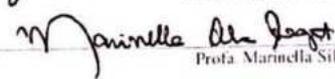
**Título da Monografia: "Avaliação da resposta antimicrobiana de pessoas vivendo com HTLV-1 contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* multirresistente"**

**Local: sala de aula da pós graduação II do IMPG / CCS / UFRJ**

**Data e hora de início: 12 de dezembro 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 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 12 de ~~dezembro~~ de 2023.

NOTA:	Banca Examinadora:
<u>10,0</u>	 _____ Prof. Alberto Félix da Nóbrega (Presidente)
<u>10,0</u>	 _____ Prof. Anderson Guimarães
<u>10,0</u>	 _____ Prof. Raquel Soares Casacs
	_____ Prof. Alessandra Filardy (Suplente)
Aluno(a):	 _____ Juliana Pinheiro dos Santos Abreu
Orientador(a) (e coorientador):	 _____ Prof. Juliana Echevarria Lima
Coordenadora de TCC:	 _____ Prof. Marinella Silva Laport

A minha mãe, que sempre me entendeu e me incentivou a seguir meus sonhos. Que foi o motivo para eu ter escolhido esse curso e essa linha de pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Juliana Echevarria, por me acolher em seu laboratório. Como entrei na faculdade no período da pandemia, eu não tinha nenhuma experiência prática de laboratório e não sabia nem usar uma pipeta direito, então agradeço muito a professora por tudo o que ela me ensinou, sempre com muita paciência e gentileza.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Imunologia Básica e Aplicada (LIBA), em especial a Clarice Constancio, Thais Oliveira e Maria Clara Campos. Elas sempre me permitiam acompanhá-las e respondiam minhas perguntas com muita paciência, além de serem ótimas companhias e me ajudarem a relaxar durante a loucura dos experimentos. Agradeço especialmente a Thais, que foi quase uma coorientadora e me auxiliou muito durante os experimentos.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Estudos em Imunologia (LEI), em especial a professora Priscilla Olsen e a Thaynara Silva, por aceitarem a colaboração com o meu trabalho, pela ajuda nos experimentos com a *E. coli* e por me ensinarem sempre com muita paciência.

Agradeço a todos os integrantes do Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias (BMB), em especial a Mari e Alice, pela ajuda nos experimentos com a *S. aureus* e por me ensinarem praticamente tudo o que sei sobre o manejo de bactérias.

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Intermediário de Biologia de Linfócitos, por me cederem alguns anticorpos e amostras de pacientes NI utilizados durante esse estudo.

Agradeço aos integrantes do Laboratório de Pesquisa em Neuroinfecções do Instituto Nacional de Infectologia (INI) FIOCRUZ, pelo acesso aos formulários eletrônicos e pelas amostras de pacientes.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pela contribuição financeira.

Agradeço a minha melhor amiga Maria, que sempre me apoiou e aguentou os meus surtos, que sempre me lembrou que cuidar de mim mesma é a prioridade.

Agradeço a minha família, em especial ao meu pai, que sempre me apoia como dá e me permitiu estudar sem preocupações. Também agradeço especialmente as minhas madrinhas, que me acolheram e cuidaram de mim depois da passagem da minha mãe. Agradeço também ao meu irmãozinho, que sempre me tira do sério, mas que foi o meu primeiro amigo e está lá para me apoiar quando eu preciso.

Agradeço especialmente a minha mãe, que não se encontra mais nesse mundo, mas que sempre incentivou os meus sonhos e esteve do meu lado. A minha mãe foi o maior motivo para a escolha desse curso e da minha linha de pesquisa com o HTLV-1, então dedico todo o meu trabalho a ela, que você sempre olhe por mim onde você estiver.

## RESUMO

**Juliana Pinheiro dos Santos Abreu**

**Avaliação da resposta antimicrobiana de pessoas vivendo com HTLV-1 contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* multirresistente.**

**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.**

A infecção pelo Vírus Linfotrófico de Células T Humanas do tipo 1 (HTLV-1) é endêmica no Brasil e está associada com o desenvolvimento de doenças inflamatórias, como a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (MAH/PET). Trata-se de uma doença neuro-inflamatória crônica, induzida por linfócitos T infectados com infiltração ativa e secreção de citocinas inflamatórias, o que resulta em morte neuronal e perda da bainha de mielina. Lesões no sistema nervoso central (SNC) induzem à perda progressiva da capacidade motora dos membros inferiores, podendo ocasionar como consequência à dependência da cadeira de rodas e reduzindo assim a qualidade de vida. A infecção pelo HTLV-1 parece promover um desequilíbrio na resposta imune contra outros patógenos e está associada a maior suscetibilidade a doenças outras infecciosas. Um exemplo são as infecções urinárias causadas por *E. coli* e a dermatite infectiva causada por *S. aureus*. Assim, objetivo deste trabalho foi estudar como a resposta imune humoral de pessoas vivendo com HTLV-1 se comporta frente a infecções bacterianas e se há alguma alteração na mesma associada aos quadros de persistência de coinfeções. Para tal, investigou-se a presença e funcionalidade de imunoglobulinas (Ig) antimicrobianas através de amostras de soro e células de sangue periférico obtidas de indivíduos HTLV-1<sup>+</sup> (assintomáticos-AC e MAH/PET) e de indivíduos não infectados (NI), bem como as populações de linfócitos B. Não foi observado diferenças significativas entre as frequências de subpopulações de linfócitos B em indivíduos AC se comparados aos MAH/PET. Verificou-se, utilizando ensaio de ELISA, que pessoas vivendo com HTLV-1 apresentaram maiores níveis de IgG e IgA totais em comparação aos indivíduos não infectados. Além disso, a IgM total se encontra elevada em pacientes MAH/PET se comparado a AC. Também foi observado que indivíduos assintomáticos possuem maior nível de IgG anti-*S. aureus* se comparado àqueles que possuem MAH/PET. Identificou-se que pacientes MAH/PET tem o nível elevado de IgG contra antígeno bacteriano de Gram-negativas (anti-TolC) se comparados a AC, enquanto os níveis de IgM se encontram reduzidos em pessoas HTLV-1<sup>+</sup> se comparados aos NI. Os resultados de ensaios funcionais apontaram que as bactérias incubadas com o soro são mais fagocitadas. Entretanto, as Igs obtidas de pessoas vivendo com HTLV-1 parecem apresentar menor capacidade de opsonofagocitose para *E. coli* se comparados às obtidas de indivíduos não infectados. Além disso, a adição de soro de pacientes HTLV-1<sup>+</sup> e NI exibiram a mesma capacidade de opsonofagocitose para *S. aureus*. Entretanto, a incubação com soro de doadores NI apresentou maior capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus* se comparado às pessoas HTLV-1<sup>+</sup>. Enquanto a incubação com soro de pacientes com MAH/PET não reduziu significativamente o crescimento de *S. aureus*. Por fim, nossos resultados sugerem que pessoas vivendo com HTLV-1 apresentam os níveis elevados de Imunoglobulina total e contra antígenos bacterianos, que pode ser resultante da infecção viral crônica e da exposição constante a microrganismos. Todavia, a capacidade efetora das imunoglobulinas de pessoas vivendo com HTLV-1 foi menor que a de indivíduos não infectados, corroborando o estado suscetível destes pacientes.

**Palavras-chave:** HTLV-1, infecções bacterianas oportunistas, imunoglobulinas, opsonofagocitose.

**ABSTRACT****Juliana Pinheiro dos Santos Abreu****Evaluation of the antimicrobial response from HTLV-1 infected individuals against *Escherichia coli* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*.****Orientador: Juliana Echevarria Lima****Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

Human T-Cell Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) infection is endemic in Brazil and is linked with pro-inflammatory conditions including HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). HAM/TSP is a chronic neuro-inflammatory disease, induced by infected T lymphocytes with active infiltration and secretion of inflammatory cytokines, which results in neuronal death and demyelination. Injuries in the central nervous system (CNS) induce the progressive loss of motor capacity of the lower limbs, wheelchair dependency and decrease the quality of life. HTLV-1 infection appears to promote an imbalance in the immune response against other pathogens and is associated with higher susceptibility to infectious diseases, such as, *E. coli* urinary infections and infective dermatitis caused by *S. aureus*. Therefore, this work aimed to study the humoral immune response of people living with HTLV-1 against bacterial infections and its association with cases of persistence of co-infections. Thus, we investigated the presence and functionality of antimicrobial immunoglobulins, comparing serum and blood cells samples from HTLV-1-infected individuals (HAM/TSP and asymptomatic carriers-AC) with uninfected donors (NI). We did not observe significant differences between the frequencies of B lymphocyte subpopulations in AC individuals compared to MAH/PET. The results showed that people living with HTLV-1 presented higher total IgG and IgA levels compared to uninfected individuals. Furthermore, total IgM is elevated in HAM/TSP patients compared to AC. It was observed that AC individuals have a higher levels of IgG anti-*S. aureus* compared to HAM/TSP patients. However, HAM/TSP patients exhibited an elevated level of IgG against Gram-negative antigen (anti-TolC) compared to AC, while IgM levels are reduced in HTLV-1<sup>+</sup> people compared to NI. Following, we established assays to investigate the effector functions of immunoglobulins, such as the opsonophagocytic capacity of monocytes using *E. coli* and *S. aureus* and bacterial survival assays with *S. aureus*. The results showed that the *E. coli* opsonization induced an improvement in phagocytosis. However, serum from HTLV-1-infected patients promoted a lower opsonophagocytosis than NI individuals serum. Moreover, the addition of serum from HTLV-1<sup>+</sup> and NI patients exhibited a similar ability to opsonophagocytosis of *S. aureus*. However, opsonophagocytic killing assays showed that only serum from NI donors significantly reduced *S. aureus* growth. Finally, our results suggest that HTLV-1-infected individuals have high levels of total immunoglobulin and against bacterial antigens, which may result from chronic viral infection and constant exposure to microorganisms. However, the effector capacity of immunoglobulins in people living with HTLV-1 was lower than that of uninfected individuals, corroborating the susceptible status of these patients.

**Keywords:** HTLV-1, opportunistic bacterial infections, immunoglobulins, opsonophagocytosis.

## RESUMO PARA LEIGOS

**Juliana Pinheiro dos Santos Abreu**

**Avaliação da resposta imune contra bactérias de pessoas vivendo com HTLV-1 no combate a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* multirresistente.**

**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 nível de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.**

A infecção pelo Vírus Linfotrófico de Células T Humanas do tipo 1 (HTLV-1) é encontrada na população brasileira e está associada com o desenvolvimento de doenças inflamatórias, como a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (MAH/PET). Trata-se de uma doença que causa a destruição do sistema nervoso central (SNC), que pode causar dor e perda de movimento das pernas. A doença pode levar à dependência do uso da cadeira de rodas e reduz a qualidade de vida do paciente. Além disso, os portadores do HTLV-1 podem apresentar infecções oportunistas causadas por outros vírus, bactérias etc. Um exemplo dessas doenças são as infecções urinárias de repetição causadas pela bactéria *Escherichia coli* e a dermatite infectiva causada pela bactéria *Staphylococcus aureus*. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar como a resposta imunitária, ou seja, resposta de defesa de pessoas vivendo com HTLV-1 se comporta no combate às infecções bacterianas e comparar essa resposta com a de pessoas não infectadas. Em nossos resultados observou-se que pessoas vivendo com HTLV-1 têm mais anticorpos, que são componentes da resposta de defesa, totais e contra bactérias se comparado às pessoas não infectadas. Os anticorpos podem se ligar à bactéria, facilitando a sua identificação e eliminação. Contudo, os anticorpos dos pacientes com HTLV-1 funcionam de uma forma menos eficiente do que os encontrados em pessoas não infectadas. Assim, nossos resultados sugerem que esse prejuízo na resposta contra as bactérias testadas favoreça o quadro de infecções bacterianas frequentes nesses pacientes, principalmente aqueles com MAH/PET.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**ABTS** – Sal de diamônio 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

**AC** – Assintomáticos

**ATCC** – American Type Culture Collection

**ATL** – Leucemia de células T do adulto

**BCR** – Receptor de reconhecimento de células B

**CTA** – Cystine Tryptone Agar

**CXCL10** – *C-X-C motif chemokine ligand 10*

**CXCL12** – *CXC-chemokine ligand 12*

**CXCR3** – *Chemokine C-X-C-Motif Receptor 3*

**D.O.** – Densidade óptica

**EIPEC-2** – Escala de incapacidade neurológica do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

**Fc $\gamma$ R** – Receptores para a porção Fc das imunoglobulinas

**FDC** – Células dendríticas foliculares

**FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz

**GLUT1** – Transportador de glicose

**HAM/TSP** – HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis

**HSPG** – Proteoglicano de heparan sulfato

**HTLV-1** – Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I

**ICAM-1** – Molécula de adesão intercelular 1

**IFN $\alpha$**  – Interferon  $\alpha$

**IFN- $\gamma$**  – Interferon-gama

**Ig** – Imunoglobulina

**IL-1 $\beta$**  – Interleucina-1 $\beta$

**INI** – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

**ITU** – Infecções do trato urinário

**LFA-1** – Antígeno-1 associado a função linfocitária

**LPS** – Lipopolissacarídeos

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

**MHC** – Complexo principal de histocompatibilidade

**MTOC** – centro organizador de microtúbulos

**NI** – Não infectado

**NRP-1** – Neuropilina-1

**PRR** – Receptores de reconhecimento de padrão

**SNC** – Sistema nervoso central

**SpA** – Proteína A

**Tfh** – Linfócitos T foliculares *helper*

**TLR** – Receptores do tipo Toll

**TMB** – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina

**TNF- $\alpha$**  – Fator de necrose tumoral alfa

**TSA** – Tryptone *Soya Agar*

**TSB** – Tryptic Soy Broth

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 HTLV .....	1
1.1.1 Histórico e Epidemiologia do HTLV-1 .....	1
1.1.2 Características do HTLV-1 .....	2
1.1.3 Replicação e Infecção viral .....	4
1.1.4 Transmissão do vírus .....	6
1.2 Doenças associadas ao HTLV-1.....	9
1.2.1 Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical (MAH/PET) .....	9
1.2.2 Doenças associadas à infecção pelo HTLV-1 .....	12
1.3 Infecções bacterianas .....	13
1.3.1 Infecção urinária causada por <i>E. coli</i> .....	13
1.3.2 Infecção de pele causada por <i>S. aureus</i> .....	15
1.4 HTLV-1 e infecções bacterianas causadas por <i>E.coli</i> e <i>S.aureus</i> .....	17
1.5 Resposta contra infecções bacterianas .....	18
2 JUSTIFICATIVA .....	22
3 OBJETIVO GERAL .....	23
3.1 Objetivos específicos .....	23
4 METODOLOGIA .....	24
4.1 População de estudo .....	24
4.2 Obtenção das amostras .....	25
4.3 Imunofenotipagem .....	25
4.4 Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de para detecção de imunoglobulinas totais e específicas .....	28
4.4.1 ELISA para detecção de IgG, IgA e IgM humana total .....	28
4.4.2 ELISA para detecção de IgG e IgM anti-LPS e anti-TolC .....	28
4.4.3 ELISA para detecção de IgG anti- <i>S. aureus</i> .....	29
4.5 Cultura de células da linhagem monocítica THP1 .....	30
4.6 Obtenção e purificação de neutrófilos .....	30
4.7 Cultivo de bactérias .....	30

4.8 Ensaio de Fagocitose .....	31
4.9 Ensaio de sobrevivência de bactéria .....	32
4.10 Análise estatística .....	33
5. RESULTADOS .....	33
5.1 Caracterização da população de estudo .....	33
5.2 Avaliação do fenótipo de células B em indivíduos MAH/PET e AC .....	35
5.3 Avaliação do fenótipo de neutrófilos em indivíduos MAH/PET e AC .....	37
5.4 Indivíduos MAH/PET apresentam níveis aumentados de IgG, IgM e IgA total .....	39
5.5 Pessoas vivendo com HTLV-1 apresentam alterações nos níveis de IgG e IgM contra antígenos de bactérias Gram-negativas .....	42
5.6 Pacientes com MAH/PET apresentam menores níveis de IgG anti- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	44
5.7 Pacientes HTLV-1 <sup>+</sup> apresentam menor capacidade de opsonofagocitose do que indivíduos NI frente a <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> .....	45
5.8 Incubação com soro de indivíduos NI, AC e MAH/PET promove alteração da sobrevivência de <i>S. aureus</i> .....	49
6. Discussão .....	50
7. Conclusões .....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
9. ANEXO .....	64



## 1. Introdução

### 1.1. HTLV-1

#### 1.1.1. Histórico e Epidemiologia do HTLV-1

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I (HTLV-1) é um retrovírus humano capaz de causar doenças inflamatórias e neoplasias. Na década de 1970 estavam sendo caracterizados novos tipos de neoplasias linfoides através de análises de moléculas de superfícies. Assim, em 1977 o grupo de Uchiyama se deparou com amostras de 16 pacientes que apresentavam uma doença de caráter linfoproliferativo com um perfil que divergia daquele documentado na literatura, o que os fez deduzir que acharam um novo tipo de neoplasia de células T e a denominaram com o nome de leucemia de células T do adulto (ATL). Os pacientes portadores dessa doença possuíam células leucêmicas com características de linfócitos T, quando a maior parte das doenças leucêmicas reportadas eram causadas por neoplasias de células B (Uchiyamam, Yodoi, *et al.*, 1977). Além disso, na época ainda não se sabia que o agente etiológico da ATL era um vírus (Uchiyamam, Yodoi, *et al.*, 1977).

Em 1979, o médico e pesquisador Robert C. Gallo e seu grupo foram capazes de isolar um retrovírus humano capaz de causar câncer de uma amostra de células advinda de um paciente portador de linfoma cutâneo de células T. Em seguida, o vírus foi caracterizado e foi provada a sua relação como agente causador da leucemia de células T do adulto pela presença de anticorpos específicos contra o HTLV-1 identificado por Gallo e seu grupo. Mais tarde, também foram identificados anticorpos específicos para o mesmo vírus em portadores de paraparesia espástica tropical, uma doença neurodegenerativa identificada por Gessain *et al* (1985) em pacientes caribenhos. Dessa forma, o HTLV-1 também foi associado como agente etiológico, o vírus foi então renomeado de vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (Gallo, 2005). Desse modo, o isolamento do HTLV-1 foi um importante passo para quebrar o paradigma de que os retrovírus não eram capazes de causar neoplasias em humanos, e assim abrir portas para uma melhor compreensão e caracterização dos oncovírus humanos.

Após o isolamento do HTLV-1, outros tipos de HTLV foram identificados como o HTLV-2, isolado pelo grupo de Gallo em 1981 de um paciente de um paciente com leucemia de células pilosas, e o HTLV-3 e HTLV-4, que foram isolados a partir de indivíduos assintomáticos na África Central (Mahieux, Gessain, 2009). Contudo, o vírus HTLV-1 prevalece sendo de maior importância clínica, já que ele está associado a doenças como o

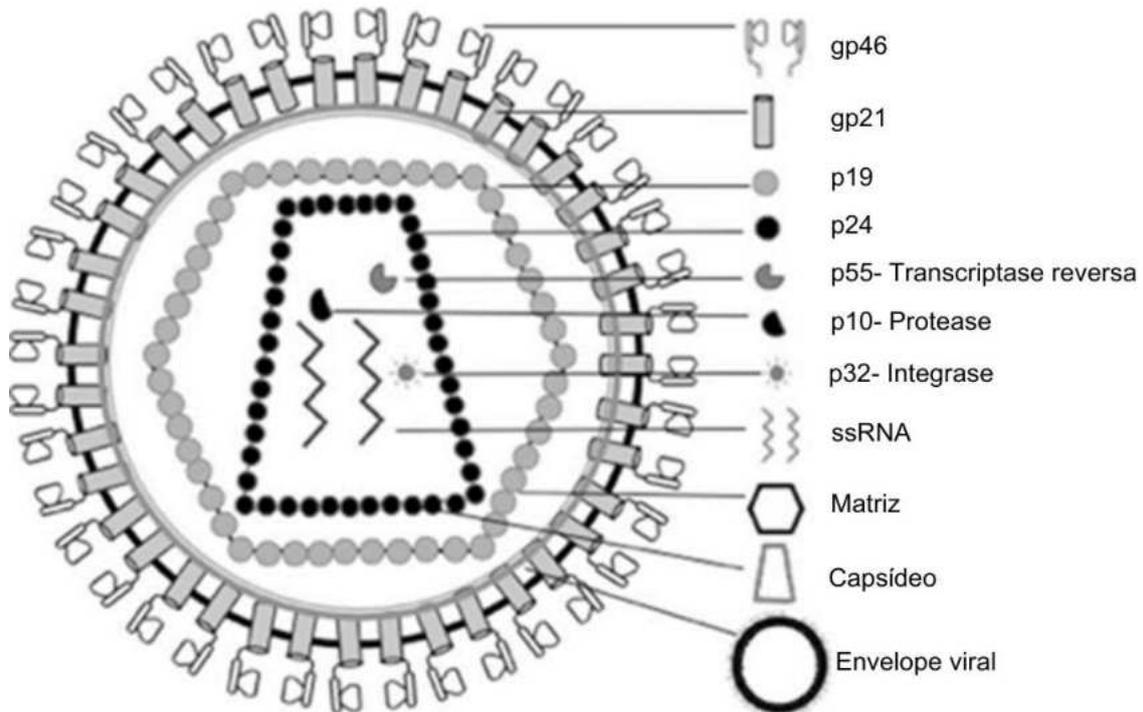
linfoma/leucemia de células T do adulto (ATLL), a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (MAH/PET), uveíte, entre outras doenças inflamatórias (Eusebio-Ponce, Anguita, *et al.*, 2019; Hoshino, 2012).

Estima-se que haja cerca de 5 a 10 milhões de pessoas vivendo com o HTLV-1 (HTLV-1<sup>+</sup>) ao redor do mundo, destas aproximadamente 1 milhão estão localizadas no Brasil (Marcusso, Van Weyenbergh, *et al.*, 2019). Todavia, esse número é subestimado uma vez que apenas 2/3 dos países do mundo foram investigados acerca da presença de pessoas infectadas pelo vírus (Marcusso, Van Weyenbergh, *et al.*, 2019). Além disso, a maioria desses estudos focou na prevalência entre doadores de sangue, mulheres grávidas e pacientes hospitalizados, sugerindo que o número de infectados na população em geral pode ser diferente do estimado (Eusebio-Ponce, Anguita, *et al.*, 2019). Os países onde há maior prevalência do HTLV-1 são o Japão (Gessain, Cassar, 2012), diversos países da África, como por exemplo Nigéria, Senegal e República Democrática do Congo (Fleming *et al.*, 1986; Williams *et al.*, 1993, 1994; Jeannel *et al.*, 1993; Gessain, Cassar, 2012) e alguns países da América Latina, tais quais Brasil, Peru e Bolívia (Eusebio-Ponce, Candel e Anguita, 2019). Apesar de haver diagnóstico para o vírus entre doadores de sangue, no Brasil a triagem pré-natal não ocorre em todo o território (Paiva, Assone, *et al.*, 2018), e no restante do mundo apenas o Japão realiza esta triagem (Kowada, 2023). As chances de pessoas vivendo com HTLV-1 desenvolverem doenças é relativamente baixa, cerca de 5 a 10 % dos indivíduos infectados (Ernzen, Panfil, 2022), ou seja, a maioria dos seus portadores são considerados carreadores assintomáticos (AC), e convivem com o vírus sem diagnóstico, dificultando ainda mais o rastreamento da prevalência desse vírus tanto em um panorama mundial, como no Brasil.

### **1.1.2. Características do HTLV-1**

O HTLV-1 é um retrovírus humano que pertence à família *Retroviridae* no gênero *Deltaretrovirus*, sua partícula viral tem sua estrutura composta de um envelope formado por dupla camada lipídica e as proteínas gp21 e gp46, que estão associadas a entrada do vírus na célula (Brites, Grassi, *et al.*, 2021). O seu capsídeo viral proteico contém o genoma viral, que é composto de 2 fitas simples de RNA de polaridade positiva, protease, transcriptase reversa, integrase, e RNase H, enzimas que facilitam a replicação viral. A transcriptase reversa é responsável pela transcrição do RNA fita simples em DNA de fita dupla, que se integra ao

genoma da célula hospedeira, tornando-se o DNA próviral (**Figura 1**; Brites, Grassi, *et al.*, 2021).

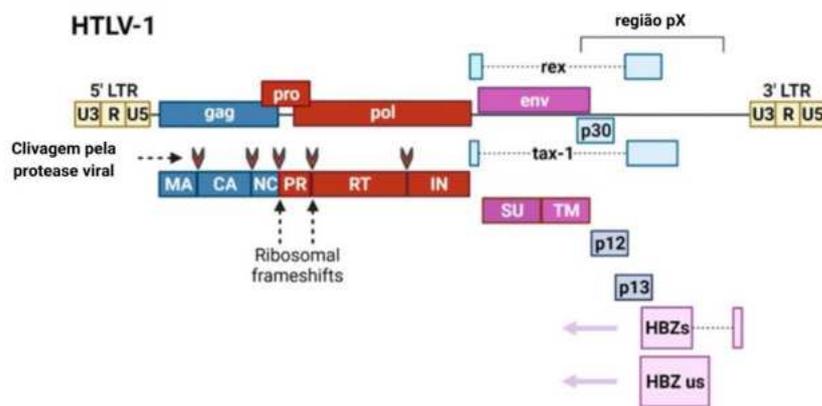


Braz J Infect Dis. 2021;25:

**Figura 1. Estrutura representativa do HTLV-1.** O HTLV-1 é um vírus com genoma viral composto de duas fitas simples de RNA de polaridade positiva, ele é envolto por uma dupla camada lipídica com as proteínas do envelope gp46 e a gp21, dentro do capsídeo além do genoma também estão as proteínas p55, p10 e p32, que codificam para transcriptase reversa, protease e integrase (Adaptado de Brites *et al.*, 2021).

O genoma da partícula viral é composto por genes estruturais, como por exemplo, os genes *gag* (que codifica proteínas do core), *pol* (que codifica a transcriptase reversa, RNase, endonuclease e protease) e *env* (que codifica a gp46 e a gp21, proteínas do envelope), limitado por uma sequência de repetição de terminal longa (LTR). Além disso, o HTLV-1 em particular possui uma região denominada de pX, localizada entre *env* e a extremidade 3'-LTR, na qual são encontradas sequências de leitura aberta (*open reading frames*, ORF), que codificam mRNA para proteínas reguladoras e acessórias, denominadas: Tax, Rex, p12, p21, p30, p13 e HBZ (**Figura 2**) (Seiki *et al.*, 1983). Essas proteínas têm, entre outras funções nas células infectadas, papel na replicação, propagação viral, na indução de instabilidades genéticas e consequentemente, surgimento de mutações (Zhao e Matsuoka, 2012; Fuzii *et al.*, 2014; Gross e Thoma-Kress, 2016). Em especial, as proteínas Tax e HBZ têm papel na patogênese das doenças associadas à infecção. A expressão de Tax está associada à indução da proliferação

celular persistente, o que leva a expansão de células infectadas, ela também está associada à desregulação da resposta imune em pacientes MAH/PET. Já a expressão de HBZ parece estar associada à redução da replicação viral e das respostas imunes, além de aumentar a infectividade do HTLV-1, bem como está associada à transformação celular (Brites, Grassi, *et al.*, 2021). Ademais, alguns achados sugerem que a expressão de HBZ pode ser compartimentalizada ou ocorrendo em conjunto com a expressão de Tax, facilitando a evasão do sistema imune e contribuindo para a patogênese da MAH/PET (Brites, Grassi, *et al.*, 2021).



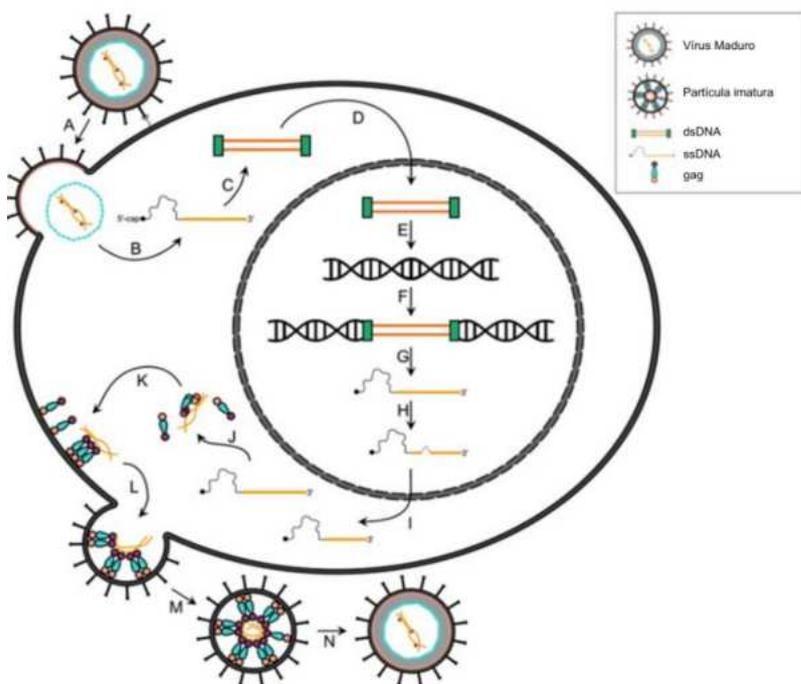
**Figura 2. Representação esquemática do genoma viral.** Os nomes de genes virais e proteínas são dadas em letras maiúsculas e minúsculas, respectivamente. as pontas de flecha vermelhas indicam locais de clivagem de proteínas. Na imagem também está representada a região pX, que é exclusiva do HTLV-1 e codifica para proteínas reguladoras e acessórias: Tax, Rex, p12, p21, p30, p13 e HBZ (baseado em Kalinichenko, Komkov, *et al.*, 2022).

### 1.1.3. Replicação e infecção viral

O HTLV-1 infecta principalmente linfócitos T CD4<sup>+</sup>, porém também tem capacidade de infectar outras células do sistema imune, tais quais linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Koyanagi *et al.*, 1993; Walter *et al.*, 1994; Hanon *et al.*, 2000; Nagai *et al.*, 2001), linfócitos B (Koyanagi *et al.*, 1993; Walter *et al.*, 1994) células dendríticas (Jones, Petrow-Sadowski, *et al.*, 2008; Pique, Jones, 2012), monócitos (Koyanagi *et al.*, 1993; Walter *et al.*, 1994) e macrófagos (Gessain, Saal *et al.* 1990; Walter *et al.*, 1994), porém em menor número (Hoshino, 2012). Em estudos *ex vivo* realizados com uma coorte de pacientes assintomáticos, portadores de ATLL e MAH/PET, foi encontrado o HTLV-1 integrado ao genoma de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, linfócitos B, monócitos e macrófagos destes pacientes (Koyanagi *et al.*, 1993). Estudo realizado *in vitro* demonstrou que células dendríticas podem ser infectadas por partículas livres do vírus, podendo tornar-se produtivamente infectadas e desempenhar um papel central na disseminação do vírus no organismo (Pique, Jones, 2012; Jones, Petrow-Sadowski, *et al.*, 2008). A variedade de alvos celulares do HTLV-1 se deve a capacidade de ligação das glicoproteínas do envelope de

interagir com receptores de superfície que estão presentes em uma grande variedade de células, sendo esses: o transportador de glicose GLUT1, o proteoglicano de heparan sulfato (HSPG) e a neuropilina-1 (NRP-1) (Martin *et al.*, 2016).

Desse modo, as proteínas do envelope viral interagem com os receptores da célula-alvo, promovendo a aproximação, adesão e fusão entre o envelope viral e a membrana da célula, resultando na liberação do genoma e às proteínas virais no citoplasma (**Figura 3**). Posteriormente à entrada, o RNA viral é transcrito em DNA de dupla-fita pela ação da transcriptase reversa e é direcionado ao núcleo da célula. No núcleo, o DNA viral é integrado ao genoma da célula pela atividade da integrase viral, resultando na estrutura denominada como próviro. Posteriormente, a sequência do próviro é transcrita e traduzido pela maquinaria da célula, gerando assim novas proteínas virais que se unem para a formação de novas partículas virais (**Figura 3**). A principal forma de propagação do vírus é a proliferação de células infectadas (Martin, *et al.*, 2016).



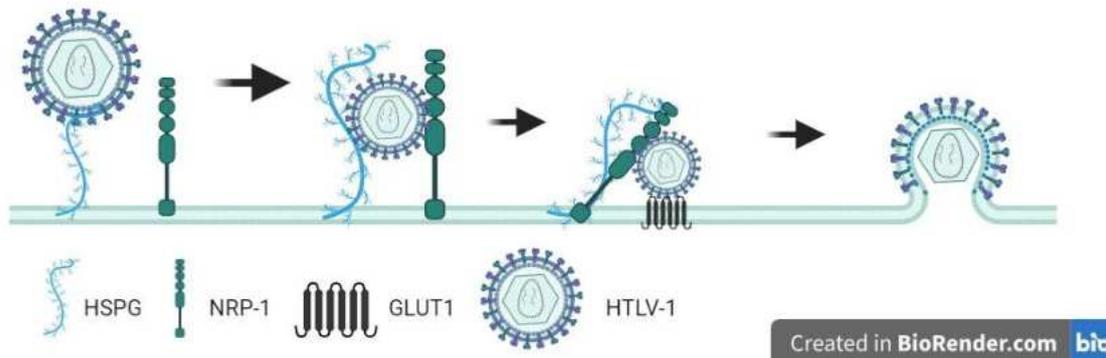
**Figura 3. Representação esquemática do ciclo do HTLV-1.** Após a interação das proteínas do envelope viral com os receptores da célula alvo ocorre a entrada do genoma do vírus no citoplasma (A), após a entrada, o genoma de fita simples RNA é convertido em DNA de fita dupla pela transcriptase reversa (B, C). Após, o genoma é direcionado ao núcleo (D) e é integrado ao genoma do hospedeiro pela atividade da integrase viral (E, F). O próviro é então transcrito pela RNA polimerase celular (G) e modificado pós-transcricionalmente (H). O mRNA viral completo é exportado do núcleo para o citoplasma (I). As proteínas virais são então traduzidas pela maquinaria celular do hospedeiro (J), e são transportadas para a membrana plasmática junto com o genoma (K). Essas proteínas virais e o genoma se reúnem em um local de brotamento para formar uma partícula viral imatura (L). A partícula em brotamento se desprende da superfície celular (M) e passa por um processo de maturação pela ação da protease viral para formar uma partícula viral madura (N) (Adaptado de Martin *et al.*, 2016).

#### 1.1.4. Transmissão do vírus

O HTLV-1 pode ser transmitido por meio do contato sexual, por contaminação sanguínea ou por meio da amamentação (Eusebio-Ponce, Anguita, *et al.*, 2019). Apesar de ser transmitido por transfusão sanguínea, foi demonstrado que produtos acelulares do sangue, como o plasma, não são infecciosos (Pique, Jones, 2012). Isso se dá provavelmente por dois motivos, o primeiro é o fato de que as partículas virais livres são pouco infecciosas: apenas 1 em cada  $10^5$ - $10^6$  vírions tem capacidade infecciosa (Kalinichenko, Komkov, *et al.*, 2022). Assim, essa rota de transmissão é muito rara com algumas exceções. Apenas alguns tipos celulares, como por exemplo, as células dendríticas podem ser susceptíveis mesmo com baixa capacidade infecciosa como demonstrado em estudos *in vitro* utilizando partículas livres (Pique, Jones, 2012). O segundo motivo é a baixa viremia da infecção, isso ocorre pois o mecanismo de persistência do HTLV-1 é pela expansão clonal, principalmente (Pique, Jones, 2012). Estudos realizados em sangue periférico de indivíduos infectados demonstraram que há alta quantidade de clones com o mesmo sítio de integração, derivados de uma célula infectada com o próviro integrado ao seu genoma (Pique, Jones, 2012). Sendo assim, por conta da baixa eficiência da infecção pelo vírion a rota de transmissão do HTLV-1 se dá, principalmente, pelo contato célula a célula. Assim, a infecção pode ocorrer de 3 diferentes formas: sinapse viral, biofilme viral e baseado em condúites celulares (Kalinichenko, Komkov, *et al.*, 2022).

A sinapse viral ocorre entre duas células próximas, uma infectada pelo HTLV-1 e uma célula alvo. Ela se inicia quando a proteína do envelope *Env* se liga à molécula de HSPG, que recruta NRP-1. Após uma alteração conformacional o complexo Env/HSPG/NRP-1 facilita a associação da proteína de fusão viral gp21 ao receptor GLUT-1, promovendo a fusão do vírus com a membrana celular (**Figura 4**) (Ghez, *et al.*, 2010; Yasunaga, Matsuoka, 2014; Fujisawa, 2017). A interação é estabilizada pela ligação da molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e o antígeno-1 associado a função linfocitária (LFA-1) (Starling, Jolly, 2016). Por conseguinte, ocorre a polarização do centro organizador de microtúbulos (MTOC) desencadeado pela via de sinalização Ras-MEK-ERK, que ativa a reorganização do citoesqueleto (**Figura 5A**). Tais eventos levam ao acúmulo de *Gag*, *Env* e RNA viral no meio intercelular e promovem a transferência do vírus (Barnard, Igakura, *et al.*, 2005; Nejmeddine, Negi, *et al.*, 2009; Igakura, Stinchcombe, *et al.*, 2003). A proteína viral Tax também tem papel nesse mecanismo e atua sinergicamente com a ICAM, ativando a via de sinalização CREB, aumentando a expressão da

proteína de ligação ao GTP, que regula a reorganização do citoesqueleto e migração celular (Chevalier, Turpin, *et al.*, 2014; Kalinichenko, Komkov, *et al.*, 2022).



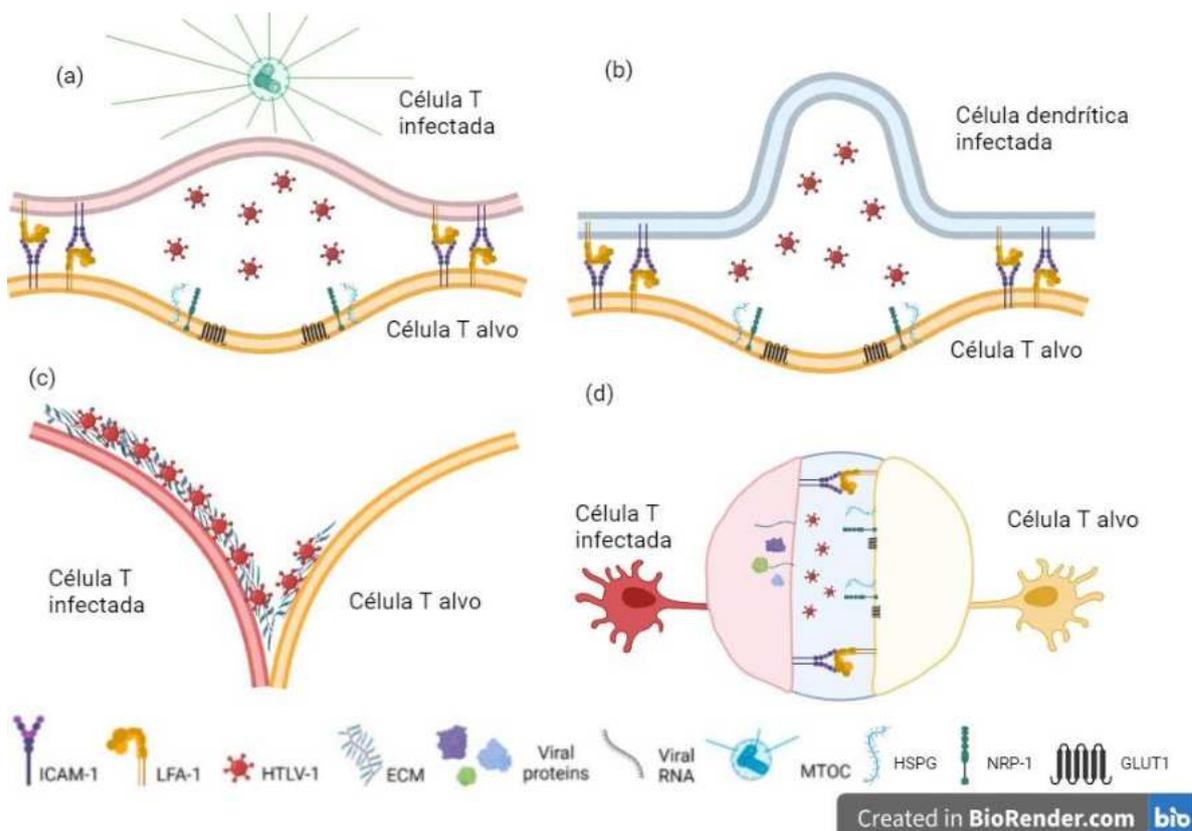
**Figura 4. Representação esquemática da entrada do HTLV-1 na célula.** Modelo da entrada do HTLV-1 na célula proposto por Ghez *et al.*, (2010). O HTLV-1 se liga a HSPG, que recruta NRP-1, após ocorre uma mudança conformacional no complexo HTLV/HSPG/NRP-1, facilitando a associação da proteína de fusão viral ao receptor GLUT-1, e promovendo a fusão do vírus com a membrana celular (Esquema baseado em Ghez, *et al.*, 2010; Yasunaga, Matsuoka, 2014; Fujisawa, 2017).

Células apresentadoras de antígenos (APC's), como células dendríticas, podem ser os primeiros alvos do HTLV-1 durante a transmissão por relação sexual via mucosa (Alais, Mahieux, *et al.*, 2015; Rocamonde, Carcone, *et al.*, 2019). Estudos *in vitro* revelaram que as células dendríticas podem produzir partículas infecciosas e infectar linfócitos T. A interação entre a célula hospedeira e a célula alvo também é estabilizada pela ligação entre ICAM e LFA-1 e dependente de HSPG e NRP-1 (**Figura 5B**). Essa infecção pode ser do tipo *trans* ou *cis*. A infecção do tipo *trans* ocorre quando células dendríticas capturam o vírus livre e logo após o transferem para células T alvo antes de se tornarem infectadas. Já a transmissão do tipo *cis* ocorre quando o vírus é internalizado pelas células dendríticas, integrado ao genoma da célula, produz novas partículas virais, e infecta a célula T posteriormente (Jones, Petrow-Sadowski, *et al.*, 2008; Martin-Latil, Gnädig, *et al.*, 2012).

Foi reportado que o HTLV-1 é o único vírus (Kalinichenko, Komkov, *et al.*, 2022) até o momento com capacidade de formar uma estrutura denominada como biofilme viral (**Figura 5C**). Assim, esse biofilme é formado por matriz extracelular na superfície de células infectadas e promove o acúmulo de vírions. Não se sabe ainda como exatamente ocorre esse mecanismo de transmissão, se as partículas virais se fundem com a membrana plasmática da célula alvo ou se são internalizadas e, em seguida, entram no citoplasma. Contudo sabe-se que a proteína Tax

possui um papel central na produção desse biofilme (Pais-Correia, Sachse, *et al.*, 2010; Maali, Journo, *et al.*, 2020; Kalinichenko, Komkov, *et al.*, 2022).

O HTLV-1 também pode infectar outras células via conduítes celulares, ou seja, prolongamento celulares como nanotubos que permitem a comunicação entre células distantes (**Figura 5D**). Sendo assim, essa estratégia de infecção permite a transmissão do vírus entre células mais distantes pela conexão através da emissão desses conduítes. A proteína viral p8 tem um importante papel na formação desses conduítes, pois ela é capaz de aumentar o número e tamanho destes prolongamentos. Além disso, ela aumenta os contatos intercelulares, assim elevando a eficiência da transmissão do HTLV-1 para uma célula alvo não infectada (Gerdes, Bukoreshtliev, *et al.*, 2007; Fukumoto, Andresen, *et al.*, 2009; Van Prooyen, Gold *et al.*, 2010; Kalinichenko, Komkov, *et al.*, 2022).



**Figura 5. Representação esquemática dos mecanismos de transmissão célula a célula do HTLV-1.** Na figura (A) está representada a sinapse viral que ocorre entre células próximas. Em (B) está representada a sinapse viral que ocorre entre células mediada por APC's. Em (C) está uma representação do biofilme viral formado de matriz extracelular. Em (D) está representado a infecção por conduítes que ocorre entre células distantes (Baseado em Kalinichenko, Komkov, *et al.*, 2022).

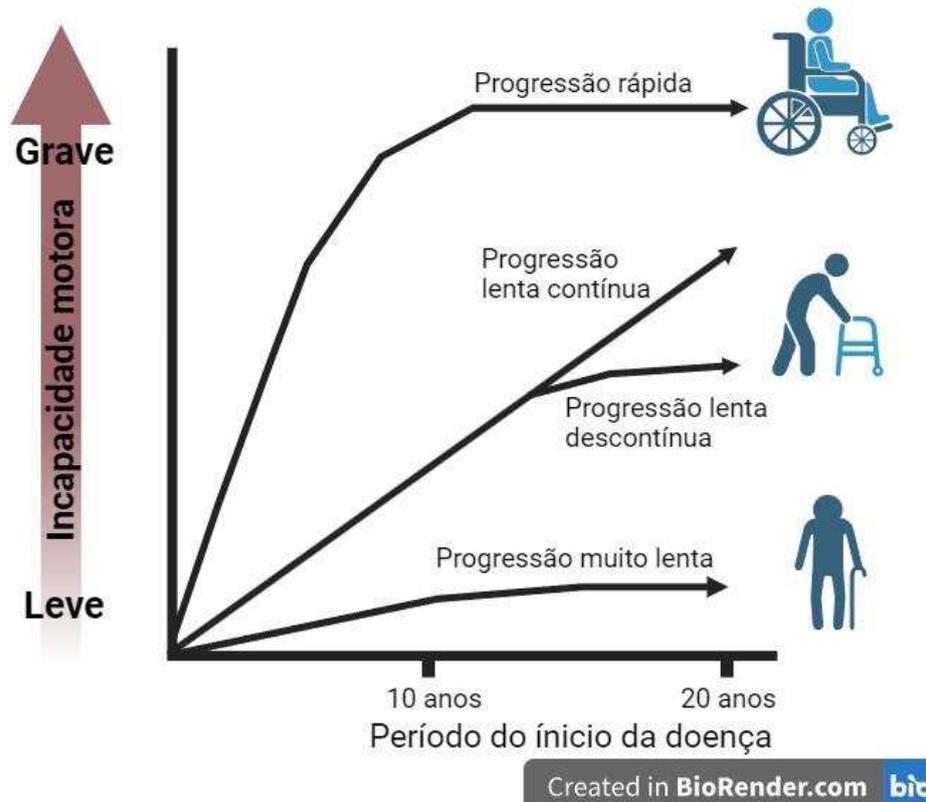
## 1.2. Doenças associadas ao HTLV-1

### 1.2.1. Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical (MAH/PET)

A Mielopatia associada ao HTLV-1 é uma doença de caráter crônico e progressivo que pode se desenvolver em pessoas vivendo com HTLV-1. Ela leva à perda progressiva da capacidade motora dos membros inferiores, diminuindo a qualidade de vida e podendo levar à dependência de cadeira de rodas. A chance de desenvolver a doença é relativamente pequena, estima-se que entre 0,25% (no Japão; Kaplan *et al.*, 1990) – 5,3% (no Brasil; Romanelli *et al.*, 2013) entre os doadores de sangue, contudo ela possui grande interesse clínico, já que causa lesões irreversíveis ao sistema nervoso central (SNC) (Orland *et al.*, 2003).

Ademais, não se tem nenhuma vacina ou antiviral contra o HTLV-1, e o tratamento atual da MAH/PET é eficaz apenas para melhora dos sintomas e aumento da qualidade de vida (Araujo *et al.*, 2020). O tratamento é feito para modular ou suprimir o sistema imune através do uso de corticoides, ele é eficaz especialmente nos primeiros anos da doença, onde o processo inflamatório no SNC é intenso (Arimura *et al.*, 2007; Nagai *et al.* 2013; Saito *et al.*, 2004; Tamaki *et al.*, 2019). No Japão o uso de interferon  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) tem sido utilizado para o tratamento da MAH/PET (Arimura *et al.*, 2007). Entretanto, o tratamento não é eficaz em parar o curso natural da doença e as lesões no SNC continuarão a ocorrer. Também se faz uso de medicamentos que amenizem outros sintomas da doença, os pacientes podem apresentar quadros de dor intensa, constipação e comprometimento urinário (Bangham, *et al.*, 2015).

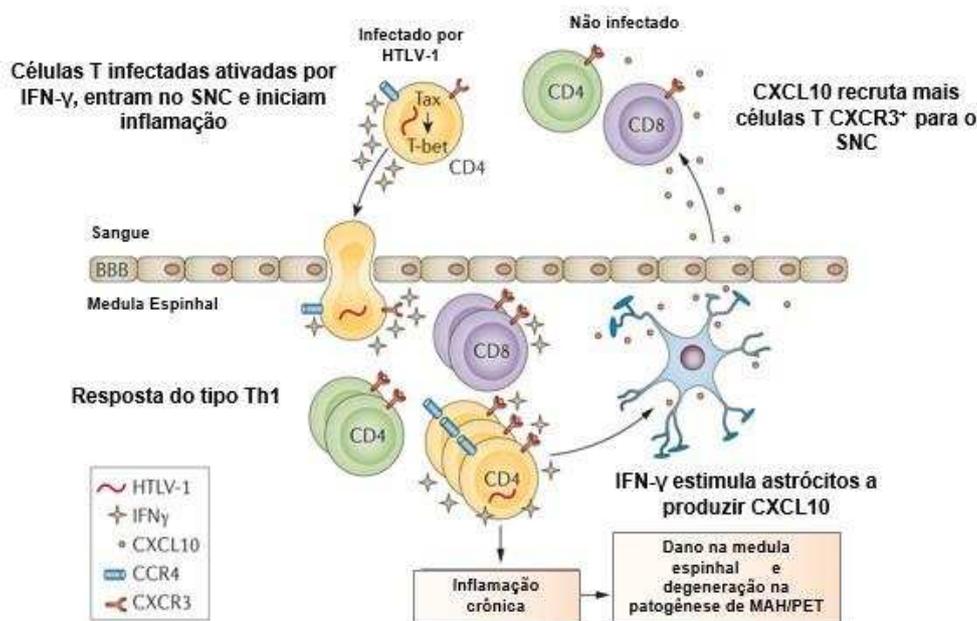
Apesar da doença ser considerada de caráter progressivo, onde ela usualmente se inicia na fase adulta e o pico de desenvolvimento dos sintomas é por volta de 40-50 anos, há casos na literatura de pessoas que desenvolveram a doença meses após serem infectadas pelo vírus. Esse tipo de progressão rápida de desenvolvimento da doença está associado com a intensificação dos sintomas em um curto período (Nagai *et al.*, 1998; Coler-Reilly *et al.*, 2016). Além disso, outro fator de risco para a rápida progressão dos sintomas é a carga próviral (Nakagawa *et al.*, 1995; Olindo *et al.*, 2006) (**Figura 6**).



**Figura 6. Representação esquemática da progressão da doença.** A progressão da doença varia entre os pacientes. A progressão da doença pode ser de maneira muito lenta, lenta contínua, lenta descontínua ou de progressão rápida. Inicialmente os sintomas da MAH/PET se apresentam como fraqueza ou rigidez nos membros inferiores, progredindo para uma marcha espástica, podendo levar a dependência de bengala ou andadores (muito lenta), e, por fim, em casos graves leva a dependência de cadeira de rodas (progressão rápida) (Esquema baseado em Yamano, Sato, 2012).

Os principais sintomas clínicos da doença são a disfunção motora e sensorial dos membros inferiores e distúrbios esfinterianos da bexiga e intestino. Inicialmente, a disfunção motora se apresenta como uma fraqueza ou rigidez dos membros inferiores, progredindo para uma marcha espástica, e por fim, nos casos mais graves, o paciente se torna dependente de cadeira de rodas. Eles também podem apresentar consequências do distúrbio sensorial nos membros inferiores, tais quais parestesias, dor e dormência (Yamauchi, Araya, *et al.*, 2021). O grau de acometimento motor dos pacientes pode ser avaliado pela escala de incapacidade neurológica do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (EIPEC-2) (Lima, Bica e Araújo, 2005) ou pela Escala de Incapacidade de Osame (Osame *et al.*, 1990). Os pacientes podem apresentar constipação ou bexiga neurogênica, aumento de frequência, noctúria (ou diurese noturna), incontinência urinária ou podem apresentar retenção culminando na necessidade de uso de cateter (Yamauchi, Araya, *et al.*, 2021).

Ainda não se entende completamente o mecanismo que leva ao desenvolvimento da MAH/PET, contudo a hipótese mais aceita é do modelo *bystander*, onde células T CD4<sup>+</sup> infectadas pelo HTLV-1 são ativadas e migram para a região da medula espinhal, mais comumente para região torácica (Umehara *et al.*, 1993). Lá as células T CD4<sup>+</sup> atravessam a barreira hematoencefálica e secretam citocinas inflamatórias no local, levando a ativação de astrócitos, que passam a produzir e secretar quimiocinas (CXCL9, CXCL10 e CXCL11). As quimiocinas promovem tanto o recrutamento tanto de linfócitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> quanto de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, além de fagócitos (Enose-Akahata *et al.*, 2012; Bangham *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2021). A intensa resposta imune local promove a morte neuronal e perda da bainha de mielina (**Figura 7**) (Jacobson, *et al* 1990; Nagai, Yamano *et al*, 2001; Fuzii *et al.*, 2014).



**Figura 7. Modelo esquemático proposto para manutenção da inflamação crônica na medula espinhal de pacientes MAH/PET.** Os linfócitos T CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> liberam IFN- $\gamma$ , que estimula os astrócitos a produzirem CXCL10. A quimiocina promove o recrutamento de células T CXCR3<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$ , assim promovendo o processo inflamatório crônico no local (Adaptado de Charles RM Bangham *et al.*, 2015).

O infiltrado de células durante a MAH/PET é caracterizado pela presença de linfócitos do tipo Th1 (Goon *et al.*, 2002; Narikawa *et al.*, 2005), que expressam citocinas pró-inflamatórias, tais quais Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), Fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Umehara *et al.*, 1993). Também já foi demonstrado que as células T

CD4<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup> infectadas pelo HTLV-1 expressam moléculas comuns de linfócitos Th1, como T-bet, INF- $\gamma$  e *Chemokine C-X-C-Motif Receptor 3* (CXCR3) (Araya *et al.*, 2014). Foi demonstrado que a maior expressão de INF- $\gamma$  tem um papel fundamental na manutenção da doença, a hipótese é que essa citocina estimula astrócitos a produzirem a quimiocina *C-X-C motif chemokine ligand 10* (CXCL10), que induz a migração de células T CXCR3<sup>+</sup>, essas células então irão produzir mais INF- $\gamma$ , resultando na migração contínua de células e promovendo a manutenção da inflamação no local (Ando *et al.*, 2013; Bangham *et al.* 2015; Yamano, Coler-Reilly, 2017).

Posto isso, foi demonstrado que a infecção pelo HTLV-1 também pode estar relacionada a alterações de funções e frequências de células imunes. Uma maior frequência de células B foi encontrada no LCR de pessoas MAH/PET (Enose-Akahata, Azodi, *et al.*, 2018) e de células B secretoras de anticorpos anti-HTLV-1 foram detectadas tanto no sangue periférico quanto no LCR de pacientes MAH/PET (Enose-Akahata, Azodi, *et al.*, 2018). Além disso, estudos demonstram que a resposta humoral de indivíduos com HTLV-1 pode diferir da de indivíduos não infectados (Belec, Jean Georges, *et al.*, 1996). Outrossim, cerca de 47% dos pacientes HTLV-1<sup>+</sup> apresentam hipergamaglobulinemia (Belec, Jean Georges, *et al.*, 1996). A hipergamaglobulinemia pode ser resultado de infecções virais e é caracterizada pelo nível elevado de imunoglobulinas no sangue, assim causando um desequilíbrio na resposta imune (Snyder, 2018).

### **1.2.2. Doenças associadas à infecção pelo HTLV-1**

Além da MAH/PET, outra doença associada ao HTLV-1 que levanta grande interesse clínico é a Leucemia de Células T do adulto (ATL), que configura um processo carcinogênico. O risco de desenvolver a doença é de cerca de 2% a 7% entre os indivíduos infectados no Japão (Schierhout, McGregor *et al.*, 2020). Ela é uma doença de caráter linfoproliferativo extremamente agressiva, que afeta principalmente células T CD4<sup>+</sup>. Geralmente, a ATL é fatal e pode causar uma grave imunossupressão (Rosadas, Taylor, 2022). Assim como a MAH/PET, ainda não se compreende totalmente os mecanismos que levam ao desenvolvimento da ATL. A doença parece surgir como consequência da proliferação clonal e de transformações progressivas nas células infectadas pelo HTLV-1, que adquirem um fenótipo cancerígeno (Eusebio-Ponce, Anguita, *et al.*, 2019). Ademais, estudos apontam que proteínas virais tais quais Tax e HBZ desempenham um importante papel no processo oncogênico, promovendo a

persistência viral, estimulação do crescimento e desenvolvimento de neoplasias (Philip, Zahoor, *et al.*, 2014).

Além da MAH/PET, o HTLV-1 foi associado a outras doenças de caráter inflamatório, tais quais uveíte, dermatite, polimiosite e artrite, síndrome de Sjögren, tireoidite, alveolite linfocítica, ele também parece estar associado a maior susceptibilidade a doenças infecciosas, tais quais tuberculose e estrongiloidíase (Eusebio-Ponce, Anguita, *et al.*, 2019). A infecção pelo vírus parece promover um desequilíbrio na resposta imunológica frente a outros patógenos. Estudo realizado por Grassi e colaboradores (2016), revelou uma maior incidência de tuberculose em portadores do HTLV-1 (3,3/1000 habitantes) se comparados a indivíduos não infectados (1,1/1000 habitantes).

Além de maior suscetibilidade aos casos, a presença da infecção do HTLV-1 parece também estar relacionada a um pior prognóstico dos sintomas e dificuldade em resolver processos infecciosos. Um estudo realizado por Porto e colaboradores (2004) demonstrou que indivíduos HTLV-1<sup>+</sup> têm maior suscetibilidade para a infecção com *Schistosoma mansoni* comparado a pessoas não infectadas. Além disso, nesses pacientes observa-se uma maior taxa de falha no tratamento contra a infecção por esse platelminto, contudo os autores também observaram que os indivíduos co-infectados apresentavam uma menor taxa de excreção de ovos, sugerindo uma menor carga parasitária (Porto, Santos, *et al.*, 2004). Já em estudos realizados em quadros de coinfeção entre HTLV-1 e *Strongyloides stercoralis* foi demonstrado uma maior taxa de carga parasitária, infecção crônica e doença grave (Newton, Limpuangthip, *et al.*, 1992; Robinson, Lindo, *et al.*, 1994; Dixon, Yanagihara, *et al.*, 1989; Goon, Bangham, 2004).

A infecção pelo HTLV-1 também é muito associada com o surgimento de lesões dermatológicas. Um estudo feito por LaGrenade e seu grupo no ano de 1990 com crianças da Jamaica, demonstrou que de 14 crianças apresentando dermatite infectiva, caracterizada como um quadro grave de doença eczematosa crônica com presença de crostas (Gonçalves, Proietti, *et al.*, 2010; McGill, Vyas, *et al.*, 2012), todas eram soro-positivas para HTLV-1. Corroborando esses dados, o estudo realizado por Okajima e seu grupo avaliaram a presença de doenças de pele em uma coorte de 193 pacientes vivendo com HTLV-1 pelo período de 2 anos, os resultados demonstraram que 76% dos indivíduos assintomáticos e 88% dos pacientes MAH/PET possuíam algum tipo de doença de pele, apontando uma possível relação entre a infecção pelo HTLV-1 e complicações dermatológicas (Okajima, Oliveira, *et al.*, 2013).

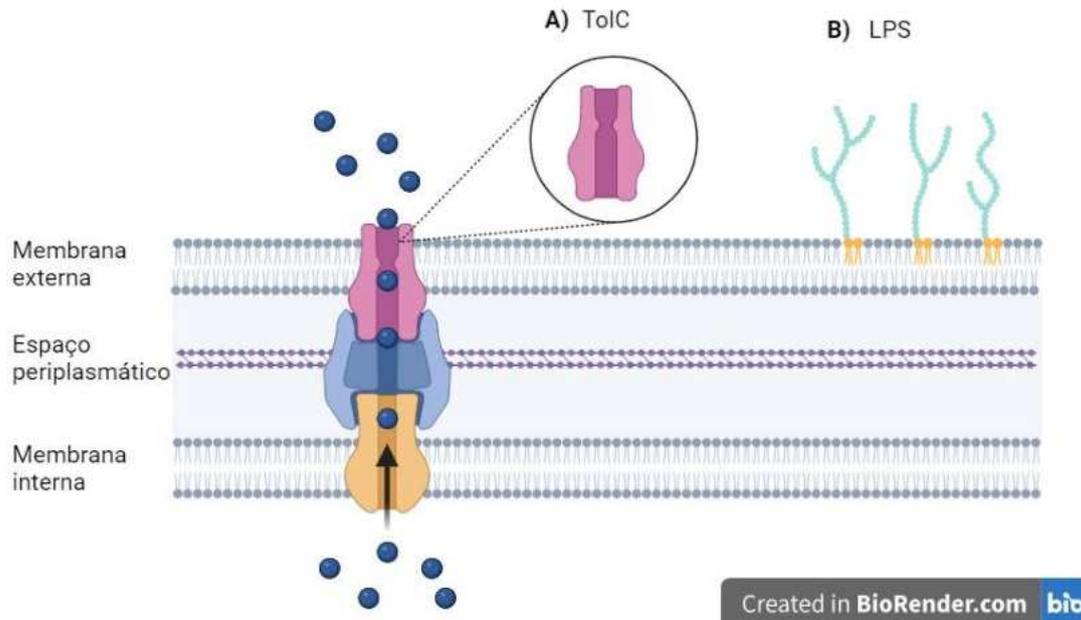
### 1.3. Infecções bacterianas

#### 1.3.1. Infecção urinária causada por *E. coli*

As infecções do trato urinário (ITU) são resultado da colonização de microrganismos no mesmo, entre as mais comuns estão as infecções causadas por bactérias, que afetam cerca de 150 milhões de pessoas por ano no mundo todo (Flores-Mireles, Walker *et al.*, 2015). As ITUs podem ser causadas tanto por bactérias Gram negativas, quanto por bactérias Gram positivas. No Brasil as ITUs são as mais comuns infecções nosocomiais e estão relacionadas com o aumento da morbidade em hospitais. A bactéria mais comumente encontrada nestas infecções foi a *E. coli* (Almeida, Simões e Raddi., 2007), bactéria Gram-negativa e com perfil de resistência a antibióticos (Almeida, Simões e Raddi., 2007; Raeispour, Ranjbar., 2018).

As bactérias Gram-negativas apresentam esta denominação pois não retém o corante violeta utilizado no método de Gram, técnica utilizada para separar os tipos bacterianos com base na morfologia de sua parede celular (Breijyeh, Jubeh, B e Karaman, 2020). Assim, a parede das bactérias pode ser dividida em três camadas: 1) a membrana externa, que possui lipopolissacarídeos (LPS), está relacionada à proteção da bactéria e é capaz de induzir uma resposta imune (**Figura 8A**; Silhavy, Kahne e Walker, 2010); 2) o espaço periplasmático, um espaço aquoso, que contém muitas proteínas (Silhavy, Kahne e Walker, 2010); 3) a membrana interna, que está relacionada com a função estrutural, transporte e biossíntese (Breijyeh, Jubeh e Karaman, 2020). Assim, graças a essa morfologia única das bactérias Gram-negativas, elas estão comumente associadas a resistência e altas taxas de morbidade e mortalidade (Breijyeh, Jubeh e Karaman, 2020). Portanto, o tratamento das infecções urinárias se mostra um grande desafio, pois o uso de antibióticos pode alterar a microbiota e culminar no surgimento de bactérias resistentes (Flores-Mireles, Walker, *et al.*, 2015).

Há diversos mecanismos pelos quais as bactérias podem apresentar resistência, como por exemplo, a expressão de bombas de efluxo, que reduzem as concentrações intracelulares de antibióticos (Reuter *et al.*, 2020). Esses transportadores se caracterizam por serem capazes de excretar uma gama de antimicrobianos e assim conferir resistência a múltiplos antibióticos para o microrganismo (Schuldiner, 2018). Um desses transportadores mais conservados entre as bactérias Gram-negativas é a bomba de efluxo formada pelo complexo AcrAB-TolC (**Figura 8B**), que é altamente eficiente na eliminação de antimicrobianos presentes no espaço periplasmático (Blair, Richmond, Piddock *et al.*, 2014).



**Figura 8. Representação visual do LPS e da proteína TolC encontrados em bactérias Gram-negativas.** (A) Representação da estrutura do LPS, que está presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas e, portanto, pode entrar em contato com o sistema imune e induzir resposta. (B) Representação da estrutura da bomba de efluxo formada pelo complexo AcrAB–TolC, que é capaz de transportar vetorialmente uma gama diversificada de compostos com pouca similaridade química, conferindo resistência a um amplo espectro de antibióticos. Baseado em Schuldiner, 2018 e com a imagem criada com o site Biorender.

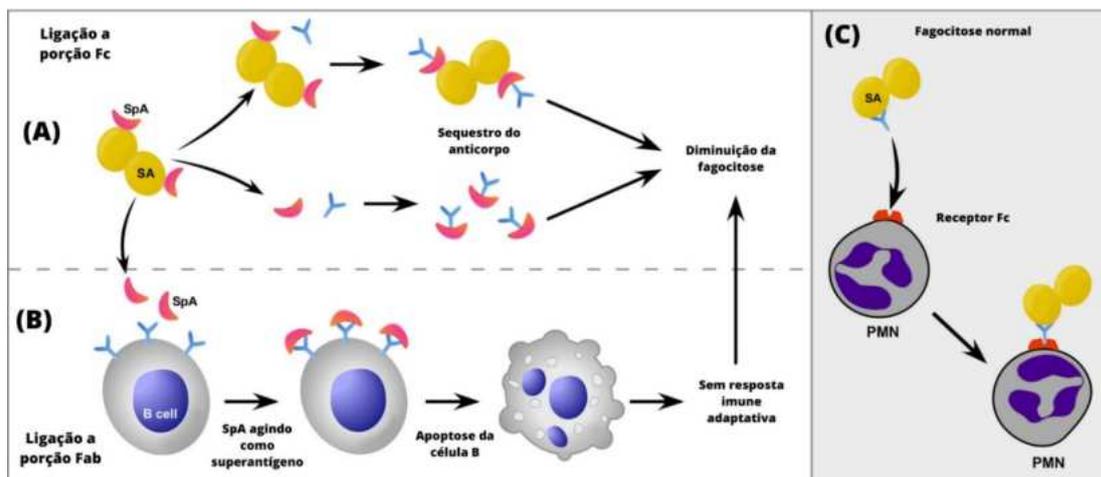
### 1.3.2. Infecção de pele causada por *S. aureus*

A pele é o maior órgão do corpo humano e está em constante contato com o meio externo, podendo ser considerada a primeira linha de defesa do corpo. A microbiota da pele, ou seja, as colônias de microrganismos comensais no local, desempenham um papel importante em manter a pele em homeostase, ao ajustar o pH, impedir a colonização de outros microrganismos que sejam prejudiciais ao corpo e estimular o sistema imune para assim promover a imunocompetência (Parlet, Brown e Horswill., 2019). Entre a microbiota da pele, as bactérias do gênero *Staphylococcus* são um dos seus colonizadores mais comuns (Parlet, Brown e Horswill., 2019). O gênero *Staphylococcus* é composto por cocos que possuem uma espessa camada de peptidoglicana, que retém o cristal violeta no método de coloração de Gram, assim classificando esse gênero como bactérias Gram-positivas (Sizar, Leslie e Unakal, 2023).

Uma grande parte das bactérias do gênero *Staphylococcus* são comensais, contudo há também patógenos oportunistas, sendo a *Staphylococcus aureus* a espécie que recebe o maior destaque. Apesar dessa bactéria estar em relativamente menor quantidade na pele em comparação com outras espécies dentro do gênero *Staphylococcus*, ela é responsável por cerca

de 70% dos casos de infecções de pele e está relacionada a surtos de infecções nosocomiais e associadas à comunidade (Parlet, Brown e Horswill., 2019; Andrade, *et al.*, 2020). A infecção causada por essa bactéria está associada desde pequenas lesões de pele até as mais graves, como no caso de furúnculos e abscessos, que apesar de não apresentarem um risco à vida podem causar muita dor (Cheung, Bae e Otto, 2021).

A bactéria persiste tanto em infecções nosocomiais quanto comunitárias por conta de seu perfil de resistência a antibióticos, sendo a *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) endêmica em hospitais e é a principal bactéria envolvida em infecções nosocomiais. Além do perfil de resistência que prejudica o seu tratamento e promove a persistência, a *Staphylococcus aureus* possui diversos mecanismos de escape do sistema imune, entre eles podemos destacar o papel da proteína A (SpA), que é encontrada na parede celular da bactéria e pode ser secretada (Kobayashi, DeLeo, 2013). A SpA tem afinidade pela porção Fc das imunoglobulinas e ao se ligar a elas consegue impedir o processo de opsonização da bactéria, assim diminuindo sua chance de ser fagocitada (**Figura 9A-C**). Além disso, a SpA também se liga a região Fab do receptor de células B, a IgM ancorada na membrana, agindo como um superantígeno e promovendo a apoptose (**Figura 9B**; Cheung, Bae e Otto, 2021).



**Figura 9. Mecanismos de escape associados à proteína SpA encontrada em *S. aureus*.** (A) Representação da ligação da proteína A (SpA) a porção Fc das imunoglobulinas e consequente sequestro dos anticorpos, assim diminuindo a fagocitose. (B) Proteína SpA se liga a porção Fc das células B agindo como um superantígeno e promovendo apoptose, também culminando com a diminuição da fagocitose. (C) Representação do processo de fagocitose normal, onde a bactéria opsonizada com o anticorpo se liga pelo anticorpo ao receptor Fc de uma célula fagocítica, no caso da imagem um neutrófilo (PMN). Figura adaptada de Kobayashi, DeLeo, 2013.

#### 1.4. HTLV-1 e infecções bacterianas causadas por *E. coli* e *S. aureus*

Cerca de 16 condições clínicas diferentes de coinfeção foram relacionadas à infecção pelo HTLV-1 e entre elas estão as infecções do trato urinário (ITUs) (Rosadas, Taylor, 2022). Um estudo feito com doadores de sangue nos Estados Unidos demonstrou que pessoas vivendo com HTLV-1 têm maior chance de desenvolver infecção da bexiga e rins, com uma média de 1,75 casos no período aproximado de 4 anos, se comparado a indivíduos não infectados, cuja média é de 0,63 casos no mesmo período (Murphy, Wang, *et al.*, 2004). Em outro estudo com cerca de 115 pessoas vivendo com HTLV-1 realizado no Hospital Universitário Professor Edgard Santos (Bahia, Brasil), foi demonstrado que dentro do grupo de pacientes HTLV-1+ cerca de 48,2% não apresentavam ITU, dentro dos positivos para ITU 8,5 % dos pacientes eram assintomáticos, enquanto cerca de 43,3% eram MAH/PET (Castro *et al.*, 2005). A maior frequência de casos em pacientes com MAH/PET provavelmente está relacionado com a disfunção motora decorrente da doença (Salameh, Mohajer e Daroucihe., 2015). Nesse mesmo estudo foi observado que a *E. coli* foi a bactéria mais frequentemente isolada nas culturas (50%), seguida de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter spp.* Esse achado não é surpreendente visto que a *E. coli* é o agente etiológico com maior frequência em casos de infecções urinárias (Flores-Mireles, Walker, *et al.*, 2015).

Outra bactéria comumente encontrada em casos de coinfeções em pacientes vivendo com HTLV-1 é a *Staphylococcus aureus*. Como já mencionado, o HTLV-1 parece ter relação com complicações dermatológicas (La Grenade *et al.*, 1990; Okajima, Oliveira, *et al.*, 2013). Nos estudos realizados por Lagrenade o agente etiológico mais comum era a *S. aureus*, positivo em 10 dos 11 swabs coletados da pele das crianças com dermatite infectiva (LaGrenade *et al.*, 1990). Outros casos de dermatite infectiva em indivíduos vivendo com HTLV-1 tiveram amostras para a realização de cultura, as quais tiveram resultado positivo para *S. aureus* (Maragno, Casseb, *et al.*, 2009; Cassar, Einsiedel, *et al.*, 2013). Essa associação da dermatite infectiva com a presença de *S. aureus* é tão prevalente, que a presença de cultura positiva em lesões de pele ou narina inferiores para essa bactéria é considerada um critério menor para o fechamento do diagnóstico da dermatite infectiva em pessoas vivendo com HTLV-1 (La Grenade, Manns, *et al.*, 1998). Acreditava-se que os casos de dermatite infectiva associada ao HTLV-1 só ocorriam durante a infância, contudo foram relatados casos deste quadro em adultos. Atualmente, já está estabelecido que a dermatite infectiva também se inicia na fase adulta (Bittencourt, Maria, 2005; Maragno, Casseb, *et al.*, 2009; Cassar, Einsiedel, *et al.*, 2013; Bravo, 2020).

### 1.5. Resposta imune contra infecções bacterianas

O sistema imunitário é responsável por manter o corpo em homeostase e em casos de perturbação, como a infecção por um patógeno, por exemplo, ele age como uma linha de defesa. Uma gama de mecanismos pode ser desencadeada para devolver o corpo ao seu estado homeostático (Sattler, 2017). Os mecanismos podem ser divididos em dois tipos, os inatos, desencadeados por diferentes tipos celulares, que possuem estruturas capazes de reconhecer moléculas conservadas em microrganismos, os chamados receptores de reconhecimento de padrão (PRR). Já o outro tipo é conhecido como imunidade adaptativa, desencadeado por células B e/ou T, que realizam o reconhecimento específico dos de antígenos através de seus receptores (Medzhitov, 2007).

As bactérias podem ser reconhecidas por PRRs, que são expressos tanto por células imunes como por outros tipos celulares, como é o caso dos queratinócitos. Essas células epiteliais podem reconhecer a *S. aureus* através dos receptores do tipo Toll (TLR), mais especificamente TLR-1, 2 e 6, que reconhecem lipopeptídeos, ácido lipoteicoico e peptidoglicana (Miller, 2008; Krishna, Miller, 2012). Já a *E. coli* também é reconhecida pelos TLRs presentes em células do estroma e hematopoiéticas na bexiga, contudo são os TLR-4 e TLR-5, que reconhecem o LPS e flagelina bacterianos, respectivamente (Bäckhed, Söderhäll, *et al.*, 2001, Andersen-Nissen, Hawn, *et al.*, 2007). Após o reconhecimento por TLRs, as células irão produzir e secretar citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas capazes de atrair neutrófilos, as primeiras células fagocíticas a chegarem no local da infecção. As células fagocíticas são capazes de englobar partículas e compartimentalizadas em uma estrutura conhecida como fagossomo (Deshpande, Wadhwa, 2022).

Os neutrófilos são células fagocíticas originadas na medula óssea e que apresentam vida curta na circulação. Neutrófilos imaturos são caracterizados pela expressão de CXCR4<sup>+</sup>, eles são retidos na medula graças a presença de seu ligante a quimiocina *CXC-chemokine ligand 12* (*CXCL12*) secretada por células estromais. Posteriormente, a sinalização via *CXC-chemokine receptor 2* (CXCR2) junto a diminuição da expressão de CXCR4<sup>+</sup> promove a migração de neutrófilos maduros para o sangue periférico. Na circulação essas células expressam altos níveis de CD62L, CXCR2 e baixos níveis de CXCR4. Quando esses neutrófilos entram em senescência, eles aumentam expressão de CXCR4<sup>+</sup> e se dirigem para a medula, onde após

entrarem em apoptose são eliminados por macrófagos subsequentemente (Jaillon, Ponzetta, *et al.*, 2020).

Durante a resposta inflamatória citocinas como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6 induzem a regulação positiva de moléculas de adesão no endotélio e em neutrófilos. Esse fenômeno modifica a circulação de células sobre o endotélio, promovendo o rolamento, adesão e posterior transmigração para o sítio de infecção realizada pelos neutrófilos. A sinalização desencadeada pelos PRRs também induz a secreção de quimiocinas que atraem neutrófilos, como CXCL1, CXCL2, CXCL5 e CXCL8, promovendo a saída do neutrófilo da medula óssea (Ley, Laudanna, *et al.*, 2007; Krishna, Miller, 2012). No local da infecção, os neutrófilos podem lançar mão de diversos mecanismos para eliminar as bactérias. Um deles é a expressão de receptores para a porção Fc das imunoglobulinas (Fc $\gamma$ R), que irão induzir a fagocitose mediada por anticorpos. No fagossomo as bactérias serão eliminadas pela presença de espécies reativas de oxigênio, peptídeos antimicrobianos, atividade de proteases e hidrolase, ou/e pelo sequestro de nutrientes (Ley, Laudanna, *et al.*, 2007; Krishna, Miller, 2012).

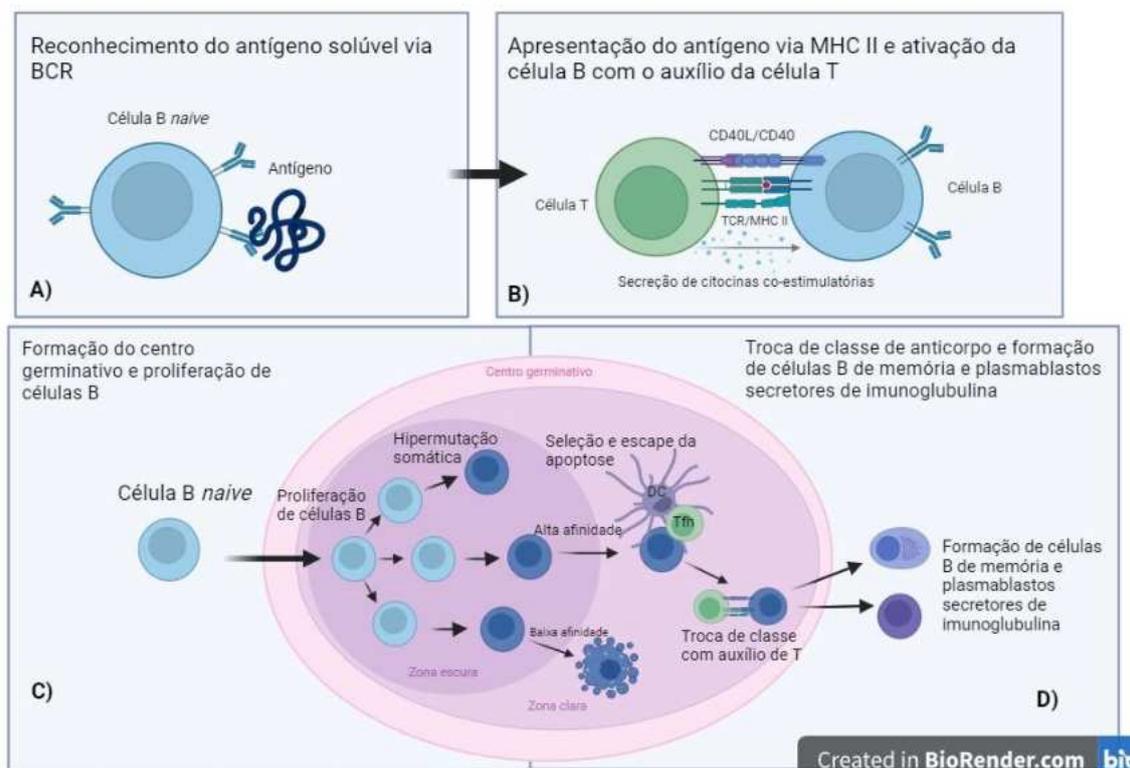
É válido ressaltar que além de neutrófilos outras células da imunidade inata também agem no local da infecção, como os monócitos. Monócitos são células fagocíticas também originadas na medula óssea, posteriormente eles adentram o sangue e circulam pelo corpo. Processos infecciosos promovem o recrutamento de monócitos para os tecidos onde fazem uso de diversos mecanismos antimicrobianos para lidar com as bactérias (Espinoza, Emmady, 2023). Os monócitos podem ser classificados de acordo com a expressão de CD14 (glicoproteína de membrana acessória do TLR-4) e de CD16 (Fc $\gamma$ RIII). A população majoritária (cerca de 90%) é classificada como monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), enquanto a menor população (cerca de 10%) se divide em intermediários (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) e não clássicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) (Ziegler-Heitbrock, Hofer, 2013). Os monócitos têm uma menor capacidade fagocítica se comparados aos neutrófilos (Steigbigel, Lambert e Remington, 1974), contudo eles são capazes de se diferenciar em macrófagos, que possuem alta capacidade fagocítica e células dendríticas (Espinoza, Emmady, 2023). As células dendríticas possuem vários receptores de reconhecimento de padrão que promovem a sua ativação. Além disso, as proteínas derivadas dos agentes infecciosos podem ser processadas, associadas às moléculas de superfície conhecidas como complexo principal de histocompatibilidade (MHC) I ou II, e posteriormente, apresentadas para células da imunidade adaptativa, os linfócitos T. (Medzhitov, 2007).

As células T com TCR $\alpha\beta$  podem ser CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>, que interagem com MHC de classe II e I, respectivamente. As células T CD8<sup>+</sup> são células citotóxicas que, geralmente, estão envolvidas na resposta organismo contra patógenos intracelulares e células tumorais (Wong, Pamer, 2003). Assim, como a maioria das cepas de *E. coli* são patógenos extracelulares (Kaper, Nataro, Mobley, 2004) e a *S. aureus* também é descrita majoritariamente como um patógeno extracelular, com exceção de algumas cepas que podem possuir um aspecto intracelular que corrobora com o escape da resposta imune (Hommes, Surewaard, 2022). Desta forma, as células T citotóxicas não são eficientes para lidar com essas bactérias. Já as células T CD4<sup>+</sup> também chamadas de linfócitos T auxiliares podem se diferenciar em diversas subpopulações, caracterizadas pela expressão de diferentes moléculas de superfícies e pela produção e secreção citocinas. Seu papel é modular as respostas de outros tipos de células imunes, como por exemplo, as células B, que estão relacionadas com a resposta imune humoral, cuja atividade é altamente eficiente no combate a patógenos extracelulares de origem bacteriana, tais quais a *E. coli* e *S. aureus* (Wik, Skålhegg, 2022, Janeway *et al.*, 2001).

As células B são células da imunidade adaptativa que podem ser ativadas de forma T independente. A ativação ocorre pelo reconhecimento de antígenos polissacarídeos, como o LPS de bactérias Gram negativas, por PRRs presente nessas células e pelo reconhecimento de antígenos pelo receptor de reconhecimento de células B (BCR), podendo ativar células B policlonalmente ou oligoclonalmente. A ativação oligoclonal depende de reconhecimento por BCR de uma concentração de antígeno pelo menos 10<sup>3</sup>–10<sup>5</sup> menor que a concentração necessária para ativação policlonal (Fleming, Castro-Dopico e Clatworthy, *et al.*, 2022, Janeway *et al.*, 2017).

As células B também podem ser ativadas por uma resposta T dependente, esta ativação ocorre nos órgãos linfoides secundários, onde os BCR's reconhecem antígenos solúveis (**Figura 10A**). Resumidamente, após a ligação via BCR, a célula endocita o complexo BCR+antígeno, processa o antígeno solúvel até formarem peptídeos e assim os apresentam para células T CD4<sup>+</sup> via MHC II. A interação também envolve o engajamento das moléculas CD40 (na célula B) e CD40-ligante (na célula T) e a secreção de citocinas, que levam a ativação das células B (**Figura 10B**). Após a ativação, há a formação de uma estrutura transiente chamada de centro germinativo, que é uma estrutura polarizada dividida em zona clara e escura. Assim, o linfócito B *naive* adentra inicialmente a zona escura do centro germinativo onde ocorrerá a proliferação e diferenciação de células B. Além disso, se dá o processo de hipermutação somática, que consiste no rearranjo de genes V que codificam as imunoglobulinas, resultando

na maturação de afinidade para um determinado antígeno (**Figura 10C**). Posteriormente, as células B saem da zona escura e adentram a zona clara, caso tenham produzido imunoglobulina de baixa afinidade a célula não receberá mais estímulos e entrará em apoptose. Já se a imunoglobulina produzida for de alta afinidade, a célula B passará por um processo de seleção feito por células dendríticas foliculares (FDC) e linfócitos T foliculares *helper* (Tfh), que auxiliam na maturação da afinidade e emitem sinais de sobrevivência para a célula. Além disso, a sinalização gerada pela interação CD40-CD40L e a presença de citocinas induz a troca de classe de anticorpo. Ao sair do centro germinativo as células B encontram-se diferenciadas em células de memória (CD27<sup>+</sup>), que possuem vida longa, podem ser reativadas e se expandir após reexposição a um antígeno específico ou em plasmablastos secretores de imunoglobulina (Ig) de alta afinidade (Mesin, Ersching e Victora, 2016; Young, Brink, 2021; King, Orban, *et al.*, 2021) (**Figura 10D**).



**Figura 10. Modelo esquemático da ativação de células B pela resposta T dependente.** (A) O antígeno solúvel é reconhecido pela célula B via BCR. (B) Posteriormente, esse antígeno é processado e apresentado via MHCII para um linfócito T, que irá auxiliar na ativação da célula B *naive*. (C) Por conseguinte, há a formação do centro germinativo, onde as células B irão proliferar e passar pelo processo de hipermutação somática na zona escura. (D) Após sair da zona escura, células B são selecionadas, interagem com FDC e Tfh. Caso seu receptor apresente alta afinidade para o antígeno, posteriormente, a célula B passará pela troca de classe de anticorpo com o auxílio do linfócito T e poderá sair do centro germinativo como célula B de memória ou plasmablasto secretor de anticorpos. Figura baseada em Küppers, 2003.

As imunoglobulinas são proteínas divididas em diferentes isotipos: IgD, IgM, IgG, IgA e IgE (King, Orban, *et al.*, 2021). Elas podem apresentar diversas funções e entre elas está a de neutralização, ou seja, a ligação a moléculas que promovem a entrada do patógeno na célula (Dörner, Radbruch, 2007); e a opsonização, que consiste no processo de se ligar e recobrir a superfície da bactéria, facilitando o seu reconhecimento através de FcRs (Thau, Asuka e Mahajan, 2023). A opsonização induz a fagocitose, citotoxicidade dependente de anticorpos e ativação da via clássica do sistema complemento (Abbas *et al.*, 2019).

A IgM é considerada uma imunoglobulina de fase aguda, ou seja, ela vai estar presente no início da infecção bacteriana e tem papel de neutralizar ou opsonizar o microrganismo. No caso das infecções bacterianas a IgA, que desempenha um papel maior na proteção das mucosas, podendo agir no processo de neutralização da bactéria. Geralmente, essa imunoglobulina apresenta em forma dimérica e está dividida em 2 subclasses: IgA1, que é mais abundante no corpo, e IgA2. Por fim, a IgG é um anticorpo de vida longa que persiste por longos períodos no corpo e tem capacidade opsonizante e de neutralização, ela é dividida em 4 subclasses. A IgG1, que é a subclasse mais abundante no corpo humano e tem grande capacidade efetora, além de ser especialmente eficiente no processo de opsonização. A IgG2, que tem uma capacidade efetora relativamente menor que as outras subclasses. A IgG3, que é a imunoglobulina com maior eficiência na ativação do complemento. E por fim a IgG4, que não tem muita capacidade opsonizante e é proposta como um inibidor de respostas efetoras (Sivick, Mobley, 2010; Justiz, Jamal, *et al.*, 2023,).

## **2. Justificativa**

Já foi demonstrado que a infecção pelo HTLV- 1 pode estar relacionada a alterações de funções e frequências de células imunes. Uma maior frequência de células B foi encontrada no LCR de pessoas MAH/PET (Enose-Akahata, Azodi, *et al.*, 2018) e de células B secretoras de anticorpos anti-HTLV-1 foram detectadas tanto no sangue periférico quanto no LCR de pacientes MAH/PET (Enose-Akahata, Azodi, *et al.*, 2018). Além disso, estudos demonstram que a resposta humoral de indivíduos com HTLV-1 pode diferir da de indivíduos não infectados. Durante o percurso da doença, pacientes podem apresentar quadros de hipergamaglobulinemia, que pode ser resultado de infecções virais e é caracterizada pelo nível elevado de imunoglobulinas no sangue, assim causando um desequilíbrio na resposta imune

(Snyder, 2018). Também já foi demonstrado que pessoas vivendo HTLV-1 são mais suscetíveis a quadros de coinfeções com outros patógenos (Goon, Bangham, 2004; Rosadas, Taylor, 2022). Assim, esses indivíduos sofrem com casos recorrentes de ITUs causadas por *E. coli* (Murphy, Wang, *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2005), e dermatite infectiva causada por *S. aureus* (La Grenade *et al.*, 1990; Okajima, Oliveira, *et al.*, 2013). Consideramos a hipótese de que alterações na produção e nas características das imunoglobulinas estejam diretamente correlacionadas com a incidência de infecções oportunistas, com destaque para infecções causadas por *E. coli* e *S. aureus*. Desse modo, o presente estudo visa investigar alguns componentes da resposta imune associados a infecções bacterianas comparando amostras obtidas de pessoas vivendo com HTLV-1 (AC e MAH/PET) e indivíduos não infectados. Esses resultados também podem contribuir com mais dados acerca das co-infecções em indivíduos vivendo com HTLV-1 e *E. coli* e *S. aureus*, já que os dados na área são escassos e na maioria das vezes tem um maior enfoque na presença e frequência destas infecções do que em alterações na resposta imune. (Belec, Jean Georges, *et al.*, 1996).

### 3. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho é investigar a presença e qualidade de anticorpos contra antígenos bacterianos em pessoas vivendo com HTLV-1, sejam assintomáticas ou MAH/PET, bem como comparar a resposta mediada por imunoglobulinas destes indivíduos com indivíduos não infectados.

#### 3.1. Objetivos específicos

- Investigar a frequência das subpopulações de células B e de neutrófilos em pessoas vivendo com HTLV-1 comparando pacientes AC e MAH/PET;
- Quantificar e comparar os níveis de IgG, IgA e IgM totais em pessoas vivendo com HTLV-1 (AC e MAH/PET) e indivíduos não infectados;
- Quantificar e comparar os níveis de anticorpos IgG e IgM, anti-ToiC e anti-LPS em plasma obtido de pessoas vivendo com HTLV-1 (AC e MAH/PET) e não infectadas;

- Quantificar e comparar os anticorpos IgG anti-*S.aureus* no plasma de pessoas vivendo com HTLV-1 (AC e MAH/PET) e não infectadas;
- Investigar a capacidade opsonofagocitose de neutrófilos e monócitos (THP1) frente a *E. coli* a partir da incubação das bactérias com plasma de indivíduos NI, AC e MAH/PET;
- Investigar a capacidade opsonofagocitose de monócitos (THP1) frente a *S. aureus* a partir da incubação das bactérias no plasma de indivíduos NI, AC e MAH/PET;
- Analisar a capacidade de inibição do crescimento bacteriano frente a *S. aureus* após incubação com o plasma de pessoas HTLV-1<sup>+</sup> e compará-los com pessoas não infectadas.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. População de estudo

A coorte desse estudo foi separada em 3 grupos: indivíduos que não apresentam infecção pelo HTLV-1 (NI), assintomáticos portadores de HTLV-1 (AC) e pessoas vivendo com HTLV-1 e com mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (MAH/PET). Os pacientes HTLV-1<sup>+</sup> foram avaliados por neurologistas do Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro/RJ. Para o levantamento dos dados clínicos, tivemos acesso aos prontuários eletrônicos desses pacientes, que são mantidos pelo INI/FIOCRUZ. A escala de incapacidade neurológica do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (EIPEC-2, Anexo 1), foi utilizada para avaliar a progressão da MAH/PET, e confere um *score* de acordo com o comprometimento neurológico do paciente. Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o projeto foi aprovado no Comitê de Ética com CAAE: 46962821.1.0000.5262. As características gerais dos voluntários estão representadas na Tabela 1 e a caracterização da coorte está na seção dos resultados (**Tabela 5**).

**Tabela 1. Características gerais dos voluntários.**

	NI	HTLV <sup>+</sup> AC	HTLV <sup>+</sup> MAH/PET
Número de amostras	18	35	55
Média de idade	57 ( $\pm$ 10 anos)	61 ( $\pm$ 13 anos)	61 ( $\pm$ 13 anos)



#### 4.2. Obtenção das amostras

As amostras foram adquiridas no período de 2021-2023. O sangue foi coletado em tubos vacutainer de EDTA e/ou de Heparina. Para fazer a separação do plasma dos pacientes, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf centrifuge 5804) a 1620 g por 10 minutos. Em seguida, com o auxílio de uma pipeta, o plasma dos pacientes foi cuidadosamente retirado, colocado em microtubos, numerados e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para o estudo foram separadas alíquotas de 50  $\mu\text{L}$  do plasma, as quais foram inativadas no aparelho Digital Heatblock (VWR scientific) a uma temperatura de  $56^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Esses plasmas inativados foram utilizados em experimentos de ELISA (Ensaio imunoenzimático) para antígenos bacterianos, fagocitose e sobrevivência de bactérias. Os demais experimentos foram realizados com alíquotas de soro não inativadas por calor (1h a  $56^{\circ}\text{C}$ ).

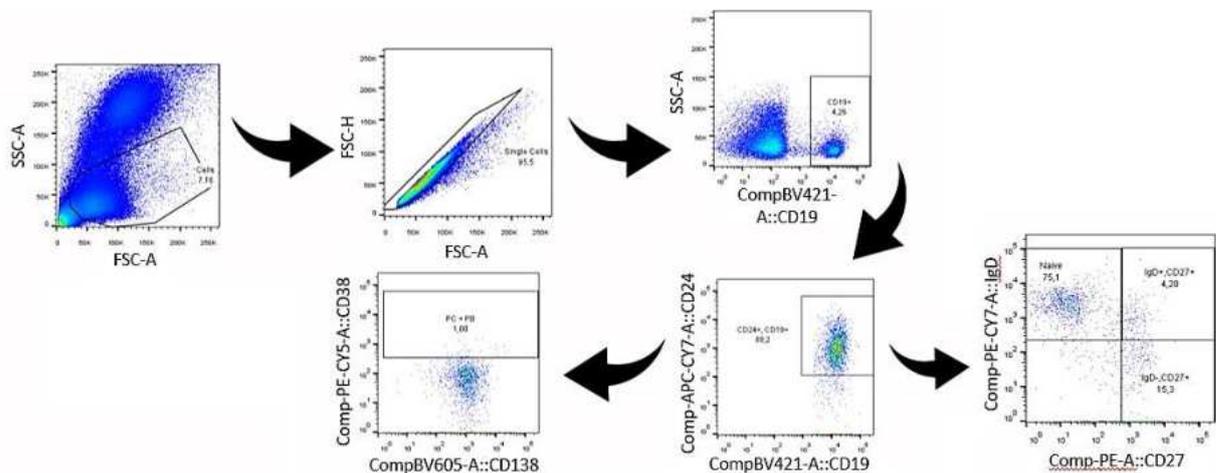
#### 4.3. Imunofenotipagem

Para a fenotipagem das populações de células B e de neutrófilos, foram separados 200  $\mu\text{L}$  do sangue total para fazer a identificação das populações de células B. Para tal, uma mistura de anticorpos monoclonais capazes de promover a identificação dos subtipos de células B. Foram utilizados anticorpos conjugados a diferentes fluorocromos (**Tabela 2**) anti-CD24, -CD19, -CD27, -CD38, -CD138 e -IgD. Após a adição dos anticorpos, a amostra foi incubada por 30 min a temperatura ambiente. Em seguida, as hemácias foram lisadas com uma solução de lise comercial (ThermoFisher). Após 10 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram lavadas 3 vezes com tampão salina-fosfato (PBS; Sigma-Aldrich/Merck), centrifugando-

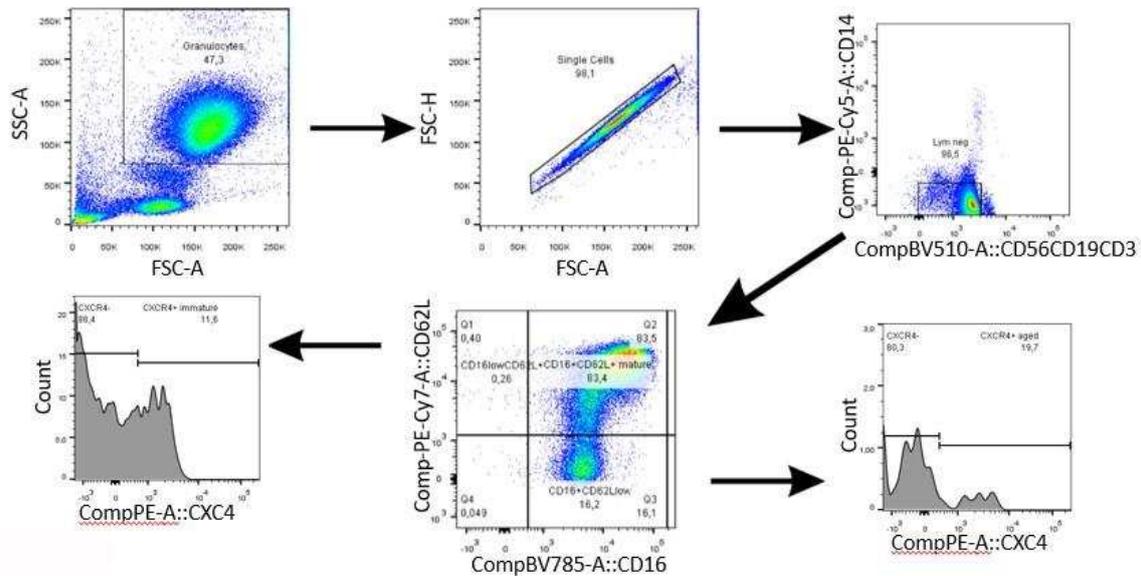
as a 400g por 5 minutos. As amostras foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de tampão de FACS (PBS + 5% de Soro Fetal Bovino + 0,1% de Azida Sódica + EDTA 1 mM) e adquiridas no citômetro de fluxo LSRFortessa (BD).

Para a fenotipagem de neutrófilos, em um volume final de 100  $\mu$ L de sangue periférico foi adicionada uma mistura de anticorpos monoclonais capazes de promover a identificação dos subtipos de neutrófilos. Foram utilizados anticorpos anti-CD56, -CD19, -CD3, -CD14, -CD16, CD62L, -CD64, CXCR1 e CXCR4 conjugados com diferentes fluorocromos (**Tabela 2**). Após 30 minutos à temperatura ambiente, as hemácias foram lisadas com uma solução de lise e fixação comercial (BD). Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente as células foram lavadas 3 vezes, centrifugando-as com PBS a 400g por 5 minutos. As amostras foram ressuspensas em 200  $\mu$ L de tampão de FACS e adquiridas no citômetro de fluxo LSRFortessa.

O software FlowJo foi usado para análise da citometria de fluxo. A estratégia de *gating* utilizada para fazer a análise da fenotipagem das células B está representada na **Figura 11**, baseada no protocolo de Rip, de Bruijn, *et al*, 2020. A estratégia de *gating* utilizada para fazer a fenotipagem de neutrófilos está representada na **Figura 12**, baseada no protocolo de Jaillon, Ponzetta, *et al.*, 2020.



**Figura 11. Representação da estratégia de *gating* para fenotipagem de células B.** O sangue total de pacientes MAH/PET e AC foram marcados com um mix de anticorpos conjugados a diferentes fluorocromos específicos para subpopulações de células B e, posteriormente, estas amostras foram analisadas por citometria de fluxo. A estratégia de *gating* utilizada foi baseada no protocolo de Rip, de Bruijn, *et al*, 2020.



**Figura 12. Representação da estratégia de *gating* para fenotipagem de neutrófilos.** O sangue total de pacientes MAH/PET e AC foram marcados com um mix de anticorpos para identificação dos subtipos de neutrófilos e, posteriormente, analisados por citometria de fluxo. A estratégia de *gating* utilizada foi baseada no protocolo de Jaillon, Ponzetta, *et al.*, 2020.

**Tabela 2. Anticorpos utilizados na citometria de fluxo.**

Anticorpo	Fluorocromo	Clone	Marca
Anti-CD24	APC Cy7	ML5	BD Biosciences
Anti-CD19	BV421	HIB19	BD Biosciences
Anti-CD27	PE	O323	eBioscience
Anti-CD39	PECy5	HIT2	BD Biosciences
Anti-CD138	BV605	MI15	Biologend
Anti-IgD	PE Cy7	IA6-2	BD Biosciences
Anti-CD56	BV510	HCD56	Biologend
Anti-CD19	BV510	HIB19	Biologend
Anti-CD3	BV510	UCHT1	Biologend
Anti-CD14	PE Cy5	61D3	BD Biosciences
Anti-CD16	BV785	3G8	Biologend
Anti-CD62L	PE Cy7	OREG56	Biologend
Anti-CD64	BV421	10.1	Biologend
Anti-CXCR1	FITC	8F-1-1-4	eBioscience
Anti-CXCR4	PE	12G5	Biogems

#### 4.4. Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de imunoglobulinas totais e específicas

##### 4.4.1. ELISA para detecção de IgG, IgA e IgM humana total

Em uma placa de 96 poços, foi utilizado o plasma de pessoas não infectadas, assintomáticas e portadoras da mielopatia associada ao HTLV-1 para sensibilizar a placa na diluição de 1:250 para a IgG e IgM total e 1:100 para a IgA total em PBS. Essa placa foi incubada *overnight* a 4°C. Em seguida, a placa foi lavada com PBS 3 vezes e bloqueada com PBS-BSA 1% pelo período de 2 horas. Após o término da incubação a placa foi novamente lavada 3 vezes nas mesmas condições, e foi adicionado o anticorpo de detecção conjugado à enzima HRP (anti-IgG humana 1:5000, anti-IgA humana 1:5000 ou anti-IgM humana 1:5000) (**Tabela 3**). A placa foi incubada por 45 minutos à temperatura ambiente. e em seguida foi lavada com PBS 3 vezes. Foram adicionados 50 µL/poço de substrato (TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) (Scienco). Após cerca de 5 minutos a reação foi parada com HCl 2M e foi feita a leitura no espectrofotômetro (SpectraMax Paradigm/Molecular Devices) a 450 nm. Os resultados foram apresentados em densidade óptica (D.O.).

**Tabela 3. Anticorpos utilizados para os ELISA para detecção de imunoglobulina humana total.**

Anticorpo	Nº de catálogo	Diluição	Marca
Anti-IgG humana conjugada a HRP	2081-05	1:5000	SouthernBiotech
Anti-IgA humana conjugada a HRP	2053-05	1:5000	SouthernBiotech
Anti-IgM humana conjugada a HRP	2023-05	1:5000	SouthernBiotech

##### 4.4.2. ELISA para detecção de IgG e IgM anti-LPS e anti-TolC

Foi utilizada uma placa de 96 poços sensibilizada com 10 µg LPS (cepa O111:B4) ou 0,38 µg de proteína TolC recombinante (*E. coli*, cepa k12) dissolvidos em PBS. Após a incubação *overnight* em temperatura ambiente, a placa foi lavada com PBS-Tween-20 0,05% (Sigma-Aldrich/Merck) 3 vezes. Em seguida, foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas com PBS-Tween-20 0,05% + BSA 1% + EDTA 0,5 mM (175 µL/poço) por 2 horas em temperatura ambiente. Após o término da incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-Tween-20 0,05%, para então, as amostras diluídas 1:640 serem adicionadas. A placa foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Após o término da incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-Tween-20 0,05%. Em seguida, foram adicionados os anticorpos de detecção conjugados à HRP (anti-IgM humana 1:2000 ou anti-IgG humana 1:5000) (**Tabela 4**). Após 1

hora de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-Tween-20 0,05%. Foram adicionados 50 µL/poço de ABTS (Sal de diamônio 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (Invitrogen/Thermo). A leitura foi feita em um espectrofotômetro (Multiskan Go da Thermo Scientific) a 405 nm a cada 5 minutos até um máximo de 45 minutos. Os resultados foram apresentados em densidade óptica (D.O.).

**Tabela 4. Anticorpos utilizados para os ELISA para detecção de anticorpos contra antígenos bacterianos.**

Anticorpo	Lote	Diluição	Marca
Anti-IgM humana conjugada a HRP	142323	1:2000	Jackson ImmunoResearch Ltd
Anti-IgG humana conjugada a HRP	141861	1:5000	Jackson ImmunoResearch Ltd
Anti-IgG humana conjugada a HRP	2040-05	1:4000	Southern Biotech

#### 4.4.3. ELISA para detecção de IgG anti-*S. aureus*

Foi utilizado uma placa de 96 poços na qual foi adsorvido  $10^6$  CFU da bactéria *S. aureus* (ST30) lisada em 50 µL/poço de tampão de carbonato de sódio (0,1 M). Após a incubação *overnight* a 4°C, a placa foi lavada 4 vezes com PBS. Após incubação *overnight* a 4°C, as ligações inespecíficas foram bloqueadas com PBS-BSA 1%. Depois de 2 horas em temperatura ambiente, a placa foi lavada 3 vezes com PBS. Em seguida, foram adicionadas as amostras nas seguintes diluições: 1:50, 1:200, 1:800, 1:3200, 1:12800 e 1:25600. Após incubação a 4°C *overnight*, a placa foi lavada 3 vezes com PBS. Logo após, as ligações inespecíficas foram bloqueadas com PBS-BSA 1% por 2 horas. Após, a placa foi lavada 3 vezes com PBS e foi adicionado o anticorpo de detecção anti-IgG humana conjugada com HRP (**Tabela 4**) na diluição 1:4000. Após 45 minutos em temperatura ambiente, a placa foi lavada 3 vezes com PBS. Foram adicionados 50 µL/poço de TMB e cerca de 5 minutos depois a reação foi parada com HCl 2M. A leitura foi realizada no espectrofotômetro (SpectraMax Paradigm/Molecular Devices) a 450 nm. Os resultados foram apresentados em densidade óptica (D.O.). Para apresentação dos resultados, foi feita a O.D. Sum, que consiste no somatório de todos os valores das D.O. da curva de diluição, seguida da razão entre a O.D. Sum e o título de IgG total (obtida no item 5.3).

Ademais, foi conduzido outro ensaio para detecção de IgG anti-*S. aureus* com duas etapas adicionais ao protocolo anterior. Essas etapas adicionais foram baseadas na metodologia de Guidry *et al* (1991) com o objetivo de reduzir as ligações inespecíficas à SpA, que possui afinidade com a porção Fc da imunoglobulina. Assim, após a incubação *overnight* com a

bactéria, a placa foi lavada 3x com PBS e, em seguida, foram adicionados 50 µL de soro de uma pessoa não infectada (diluído 1:250). Após uma incubação *overnight* a 4°C, a placa foi lavada 3 vezes com PBS e foram adicionadas as amostras. Depois de 2 horas à temperatura ambiente o ensaio prosseguiu com a metodologia descrita acima.

#### **4.5. Cultura de células da linhagem monocítica THP1**

Para os ensaios de fagocitose e ROS utilizou-se a linhagem monocítica THP1, obtida por isolamento de células do sangue periférico de um paciente com leucemia monocítica aguda (Tsuchiya, Yamabe, *et al.*, 1980). As células foram cultivadas em suspensão em garrafas de cultivo (CORNING®Flask 25 cm<sup>2</sup>) em meio RPMI-1640 (Gibco/ThermoFisher) + penicilina/estreptomicina (100 UI/ml e 100 mg/ml, LCG Biotecnologia Ltda) com 10% de SFB em incubadora (Series II Water Jacket da ThermoScientific) a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.6. Obtenção e purificação de neutrófilos**

Para a obtenção de neutrófilos foi coletado cerca de 20 ml de sangue de voluntários. Para a separação em gradiente de densidade foi utilizado uma solução de Ficoll (Histopaque-1077 da Sigma-Aldrich/ Merck), na proporção de 1:2 em relação ao sangue, centrifugando a 400 g por 30 minutos. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur os neutrófilos foram coletados e separados em outro tubo. As células foram lavadas 2 vezes com tampão de lise de hemácias ACK (8,99 g de NH<sub>4</sub>Cl + 1,0 g de KHCO<sub>3</sub> + 37,0 mg de EDTA), centrifugando-as a 300 g por 10 minutos. Por fim, foi realizada mais uma lavagem com meio RPMI, centrifugando as células a 300 g por 10 minutos. Em seguida, os neutrófilos foram ressuspensos em meio RPMI sem antibióticos e foi realizada a contagem de células na câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio (Fisher Micromaster S11033 da Thermo Fisher Scientific).

#### **4.7. Cultivo de bactérias**

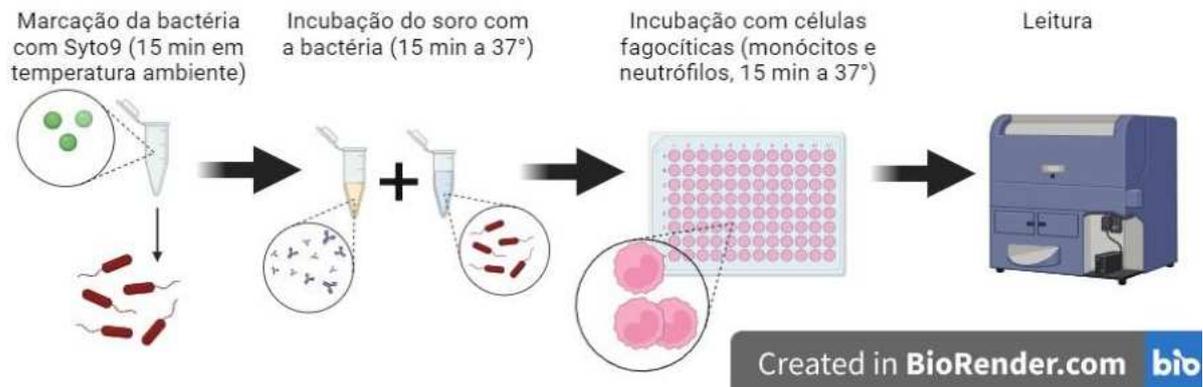
A amostra de *Staphylococcus aureus* (ST30 CR 14-021), foi cedida pelo laboratório de Biologia Molecular de Bactérias (BMB, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), oriunda de uma coleção de 600

amostras clínicas isoladas de colonização e infecção nasal, utilizadas durante a tese de mestrado de Alice Slotfeldt Viana, 2019. Após a realização de um antibiograma com essa amostra, ela se mostrou resistente a oxacilina, o que a classifica como uma MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina). A amostra utilizada neste estudo foi obtida a partir de uma única colônia do cultivo primário e foi estocada em criotubos contendo 1 mL de TSB (BD Difco, Sparks, MN, EUA) e 10% de glicerol (Merck, Darmstadt, Alemanha). Para o cultivo das amostras, o estoque foi retirado do freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , e, com o auxílio de uma alça microbiológica, foi semeada por esgotamento em placas de Petri com meio TSA (Tryptone Soya Agar, BD Difco). Após incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  por 18 horas, uma alça microbiológica foi esfregada na superfície das colônias em placa e a massa bacteriana foi transferida para 3 mL de caldo TSB (BD Difco). As bactérias foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 18 horas sob agitação constante a 250 rpm (incubadora com agitação orbital Quimis).

A amostra de *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi cedida pelo Laboratório de Estudos em Imunologia (LEI, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), oriunda de uma cepa padrão de *E. coli* da American Type Culture Collection (ATCC). A amostra foi mantida em CTA (Cystine Tryptone Agar, HIMEDIA), um meio semi-sólido de cultura que mantém a bactéria em estase, a temperatura ambiente. Para o cultivo das amostras, uma alça microbiológica foi inserida no meio CTA e a massa bacteriana foi transferida para caldo TSB (Tryptic Soy Broth, ISOFAR). Após 24 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , com o auxílio de uma alça microbiológica, uma massa bacteriana foi semeada por esgotamento em uma placa de Petri com meio TSA e incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

#### 4.8. Ensaio de Fagocitose

Para os ensaios de Fagocitose a bactéria *E. coli* (ATCC 25922, MOI=10) ou a bactéria *S. aureus* (ST30 CR14 021, MOI=10) foram, previamente, marcadas com a sonda fluorescente Syto9 (75 nM) (Invitrogen/Thermo) por 15 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as bactérias foram incubadas com soro inativado (1:20, 1:40 e 1:80) de doadores MAH/PET, AC e NI por 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, a *E. coli* ou *S. aureus* opsonizada e não opsonizada foram incubadas com células fagocíticas (Linhagem monocítica THP1 ou neutrófilos de doadores NI) por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . A fagocitose foi avaliada por citometria de fluxo FACScalibur (BD) e o software FlowJo foi usado para análise (**Figura 13**).



**Figura 13. Representação esquemática do ensaio de fagocitose.** A figura representa um esquema de como foram realizados os ensaios de fagocitose. A bactéria *E. coli* (ATCC-25922) ou *S. aureus* foi marcada com a sonda SYTO9. Em seguida, as bactérias foram incubadas com soro inativado e, posteriormente, as bactérias opsonizadas e não opsonizadas foram incubadas com monócitos por 30 min. a 37 °C, em seguida a fagocitose foi avaliada por citometria de fluxo.

#### 4.9. Ensaio de Sobrevivência de bactéria

Foi preparada uma suspensão bacteriana (D.O.=0,08) de *S. aureus* (ST30 C14 021, MOI=5) em meio TSA, da qual cerca de  $5 \times 10^6$  bactérias foram incubadas junto a um *pool* feito com os soros de pessoas NI, AC e MAH/PET. Após 15 minutos a 37°C, foram coletados 10  $\mu$ L desta suspensão e adicionadas a 90  $\mu$ L de suspensão de células THP1 ( $1 \times 10^5$  células/mL). Após uma incubação de 30 minutos a 37°C, as células foram lavadas com 1 mL de PBS, centrifugando-as a 200g por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e semeado diretamente na placa ou diluído 10 vezes. A partir dessas diluições foram feitos *spots* com aproximadamente 10  $\mu$ L em uma placa de Petri contendo meio TSA. Após cerca de 1 dia, foi feita a contagem de unidades formadoras de colônias (CFU; **Figura 14**).



**Figura 14. Representação esquemática do ensaio de sobrevivência.** A figura representa um esquema de como foram realizados os ensaios de sobrevivência. As bactérias foram incubadas com soro inativado e posteriormente as bactérias opsonizadas e não opsonizadas foram incubadas com monócitos por 30 minutos a 37 °C, em seguida a solução foi lavada e o sobrenadante foi coletado para fazermos *spots* em placas de Petri. Após um dia, foi feita a contagem de unidades formadoras de colônias.

#### 4.10. Análise Estatística

As análises foram feitas utilizando o software Graphpad Prism, para a análise da distribuição das amostras foi utilizado o teste de K-S. A análise dos títulos de IgG e IgM anti-LPS, IgG anti-TolC, IgG anti-*S. aureus* e IgG total foi utilizado o teste ANOVA do tipo não paramétrico através do teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste Dunn's. Para análise de correlação foi utilizado o teste Spearman.

Já para as análises de fagocitose e de fenotipagem foi utilizado o software Flowjo para obter a intensidade média de fluorescência (MFI) e a porcentagem de células marcadas, estes dados foram exportados para o software Graphpad Prism para realizar as análises estatísticas, através do teste não paramétrico de Mann Whitney.

## 5. Resultados

### 5.1. Caracterização da população de estudo

No total foram coletadas amostras de 108 pessoas, as quais foram divididas em 3 populações do estudo: NI (18 amostras), AC (35 amostras) e MAH/PET (55 amostras). A caracterização dessas populações foi feita através de questionários ou prontuários eletrônicos registrados no SIPEC da FIOCRUZ e está registrada na **tabela 5**.

Tabela 5. Características da população de estudo.

	NI	AC	MAH/PET
<b>Total de amostras</b>	<b>18</b>	<b>35</b>	<b>55</b>
<b>Idade (anos)<sup>a</sup></b>	<b>57 anos (± 10 anos)</b>	<b>61 anos (± 13 anos)</b>	<b>61 anos (± 13 anos)</b>
<b>Sexo<sup>b</sup></b>			
Homens	5 (27,8%)	16 (45,7%)	19 (34,5%)
Mulheres	13 (72,2%)	19 (54,3%)	36 (65,5%)
<b>Carga pró-viral<sup>c</sup></b>	<b>0</b>	<b>0.31% (IQ<sub>25-75</sub> 0,01 - 1,445)</b>	<b>1.69% (IQ<sub>25-75</sub> 1 - 3,45)</b>
<b>Escala de incapacidade<sup>d</sup></b>			
Leve (1-10 pontos)	0	0	14 (26%)
Moderada (11-21 pontos)	0	0	25 (46,3%)
Grave (≥ 22 pontos)	0	0	15 (27,7%)
<b>Bexiga neurogênica<sup>e</sup></b>	<b>0</b>	<b>1 (2,8 %)</b>	<b>20 (36,3%)</b>
<b>Comorbidades<sup>f</sup></b>			
Hipertensão	3 (16,6%)	13 (37,1%)	13 (23,6 %)
Cardiopatía	0	1 (2,8 %)	1 (1,8 %)
Diabetes	0	3 (8,6 %)	4 (7,3%)
Obesidade	0	7 (20 %)	1 (1,8 %)
Hipotireoidismo	2 (11,1 %)	1 (2,8 %)	3 (5,4%)
<b>Outros<sup>g</sup></b>			
Lesões dermatológicas	0	1 (2,8 %)	12 (27,3 %)
ITU de repetição <sup>h</sup>	1 (5,5%)	1 (2,8 %)	12 (27,3%)
<b>Coinfecções<sup>i</sup></b>			
HCV	0	1 (2,8 %)	5 (9%)
HIV	0	1 (2,8 %)	0
Doença de chagas	0	0	1 (1,8 %)

**Legenda:** <sup>a</sup> Valores estão representados como média ± desvio-padrão.

<sup>b,e,f,g,i</sup> Os valores de porcentagem representados foram calculados baseados no número total de amostras (NI-18, AC-35 e MAH/PET-55)

<sup>c</sup> Carga pró-viral em PBMCs obtida por PCR quantitativa como descrito por Silva *et al.* (2007), realizada como procedimento de rotina pelo Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções do INI/FIOCRUZ. Valores estão representados como mediana e IQ<sub>25-75</sub> (intervalo interquartil 25%-75%).

<sup>d</sup> A Escala de incapacidade neurológica do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (EIPEC) foi feita com 54 dos 55 pacientes portadores de MAH/PET, a escala não é aplicada em pacientes AC.

<sup>h</sup> Infecção do trato urinário (ITU) de repetição.

A maioria da coorte consiste em indivíduos do sexo feminino (NI-72,2%, AC-54,3% e MAH/PET 65,5 %). A carga pró-viral é considerada um fator de risco para o desenvolvimento dos sintomas (Nakagawa *et al.*, 1995; Olindo *et al.*, 2006), em nossa coorte foi observado que a carga pró-viral dos pacientes AC (0,31%) é menor se comparada aos de pacientes MAH/PET (1,69%). Ademais, entre os indivíduos MAH/PET foi aplicada a escala EIPEC para avaliar a progressão da doença através do grau de incapacidade motora, sensitiva e esfinteriana dos pacientes. O impacto neurológico da doença foi dividido em leve (1-10 pontos), moderado (11-21 pontos), e grave (≥ 22 pontos) baseado em Souza *et al* (2021). Observamos que a maioria

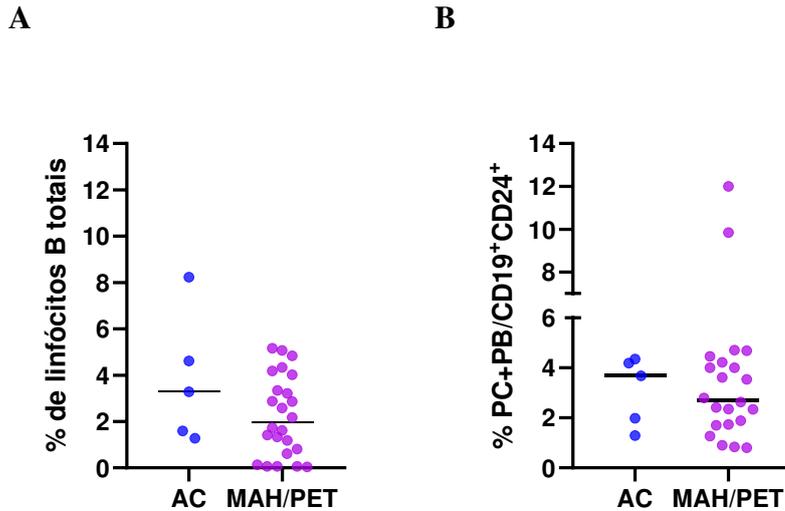
dos portadores MAH/PET da nossa coorte está em um estágio moderado da doença (46,3%), seguido de pacientes em estágio grave (27,7%) e em estágio leve (26%, **Tabela 5**).

Pessoas vivendo com HTLV-1, especialmente aquelas acometidas pela MAH/PET podem apresentar complicações no trato urinário decorrentes da doença, entre elas uma das mais comuns é a bexiga neurogênica (Iijima, Yamauchi *et al.*, 2021). Essa incidência também se repete em nossa coorte, já que uma parte dos pacientes MAH/PET (36,3%) apresentam essa disfunção. Também é comum que eles apresentem infecções no trato urinário de repetição, quadro que é observado em nossa coorte em pacientes MAH/PET (27,3%). Ademais, o quadro de infecção pelo HTLV-1 também está relacionado com o surgimento de complicações dermatológicas (La Grenade *et al.*, 1990; Okajima, Oliveira, *et al.*, 2013), o que é observado especialmente em portadores MAH/PET de nossa coorte que apresentam quadros de lesões dermatológicas (27,3%, **Tabela 5**).

Entre as populações de estudo foi observado que os pacientes, tanto AC e MAH/PET eram portadores de outras comorbidades não relacionadas à doença, tais quais: hipertensão, cardiopatia, diabetes, obesidade e hipotireoidismo, sendo a hipertensão a mais comum tanto em pacientes AC (37,1%) quanto MAH/PET (23,6 %). Além disso, em nossa população de indivíduos não infectados alguns eram portadores de hipertensão (16,6%) e hipotireoidismo (11,1%). Em nossa população de pessoas HTLV-1<sup>+</sup> foi observado quadros de coinfeção com o HCV (AC-2,8 % e MAH/PET-9%), um indivíduo HIV-1<sup>+</sup> entre os pacientes AC e um carreador da doença de Chagas entre os portadores da MAH/PET (**Tabela 5**).

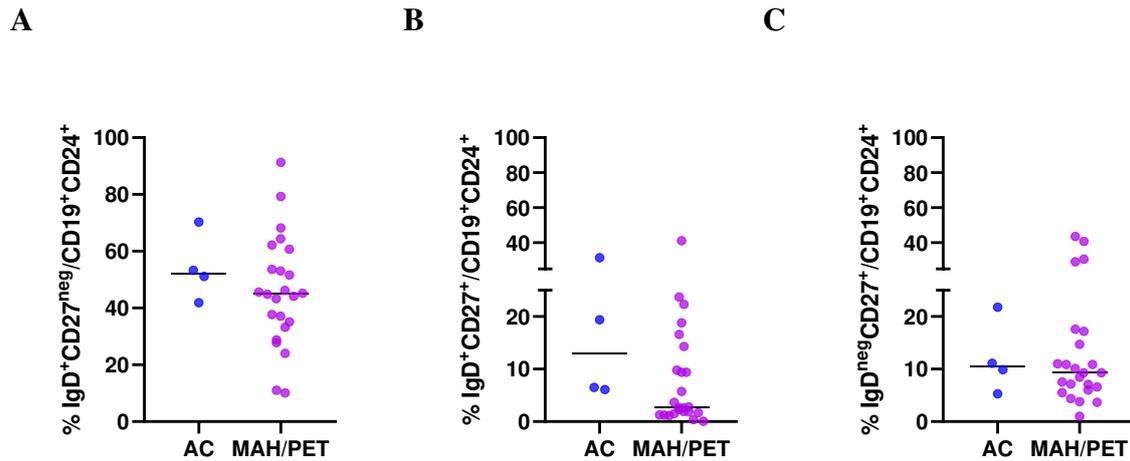
## 5.2. Avaliação do fenótipo de células B em indivíduos MAH/PET e AC

Inicialmente, foi feita uma avaliação do fenótipo de células B em pacientes MAH/PET e AC para melhor compreender como estão as frequências destas populações. Ao comparar indivíduos assintomáticos e pacientes que desenvolveram a MAH/PET pode-se compreender mais claramente a qualidade da resposta humoral destes pacientes. Na **figura 15A**, está representada a frequência de linfócitos B totais, no entanto, não se observou nenhuma diferença significativa entre os grupos avaliados. Contudo podemos observar uma tendência de diminuição da frequência da população de células B em indivíduos MAH/PET se comparados aos AC. Na frequência da população plasmablastos (PB) + plasmócitos (PC), mais uma vez não foi observada nenhuma diferença entre os pacientes (**Figura 15B**).



**Figura 15. Similaridade na frequência de linfócitos B totais e plasmócitos e plasmablastos nos pacientes AC e MAH/PET.** Avaliação do fenótipo de células B no sangue total de pacientes AC e MAH/PET feito por citometria de fluxo após marcação com um mix de anticorpos monoclonais contra moléculas encontradas nos linfócitos B (anti-CD24, -CD19, -CD27, -CD38, -CD138 e -IgD). No gráfico (A) está representada a porcentagem de linfócitos B totais. (B) Frequência de plasmablastos (PB) e plasmócitos (PC) caracterizados pela expressão de CD38<sup>+</sup> e CD138<sup>+</sup> dentro da população CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>. Cada símbolo representa um indivíduo e a barra representa o valor das mediana de cada grupo.

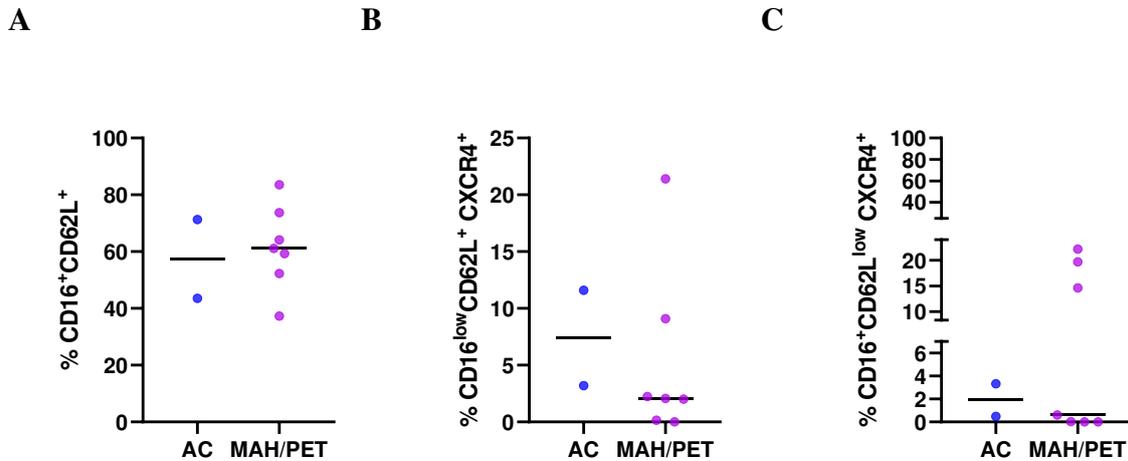
Em seguida avaliou-se as subpopulações dos linfócitos B circulantes no sangue periférico: *naive* (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD27<sup>neg</sup>IgD<sup>+</sup>), memória imatura (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>) e memória *class-switched* (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD27<sup>neg</sup>IgD<sup>neg</sup>) em pacientes MAH/PET e AC (**Figura 16**). Não foi observada nenhuma diferença nas frequências das subpopulações de linfócitos B de memória *naive* (**Figura 16A**), de células B de memória que ainda não passaram pela troca de classe de anticorpo (células de memória imaturas, **Figura 16B**) e nas células B de memória que já passaram pela troca de classe (células de memória *class-switched*, **Figura 16C**) entre os pacientes AC e MAH/PET. Entretanto, observa-se uma tendência de diminuição na frequência de células B imaturas nos pacientes MAH/PET (**Figura 16B**).



**Figura 16.** Avaliação do fenótipo de subpopulações de células B *naive* e de memória no sangue total de pacientes AC e MAH/PET realizada por citometria de fluxo. Avaliação do fenótipo de subpopulações de células B *naive* e de memória no sangue total de pacientes AC e MAH/PET realizada por citometria de fluxo após marcação com um mix de anticorpos monoclonais contra moléculas encontradas nos linfócitos B (anti-CD24, -CD19, -CD27 e -IgD). **(A)** Porcentagem de linfócitos B *naive* ( $\text{IgD}^+\text{CD27}^{\text{neg}}/\text{CD19}^+\text{CD24}^+$ ). **(B)** Frequência das células B de memória imaturas ( $\text{IgD}^+\text{CD27}^+/\text{CD19}^+\text{CD24}^+$ ). **(C)** Frequência da população de células B de memória *class-switched* ( $\text{IgD}^{\text{neg}}\text{CD27}^+/\text{CD19}^+\text{CD24}^+$ ). Cada símbolo representa um indivíduo e a barra representa o valor das mediana de cada grupo.

### 5.3. Avaliação do fenótipo de neutrófilos em indivíduos MAH/PET e AC

Foi realizada a análise do fenótipo de neutrófilos circulantes para comparar as frequências das populações em pessoas vivendo com HTLV-1 AC e MAH/PET. Os resultados parciais indicam não haver diferença na frequência de neutrófilos  $\text{CD16}^+\text{CD62L}^+$  e  $\text{CD16}^{\text{low}}\text{CD62L}^+\text{CXCR4}^+$  entre os pacientes AC e MAH/PET (**Figura 17A-B**). Entretanto, observou-se a presença de 2 grupos de pacientes MAH/PET, um apresenta uma alta frequência de neutrófilos  $\text{CD16}^+\text{CD62L}^{\text{low}}\text{CXCR4}^+$  (14,6% - 22,2%) e o outro uma reduzida frequência desta população de neutrófilos (0 - 0,61%) quando comparada à frequência encontrada nos indivíduos AC (0,48 - 3,33%) (**Figura 17C**).



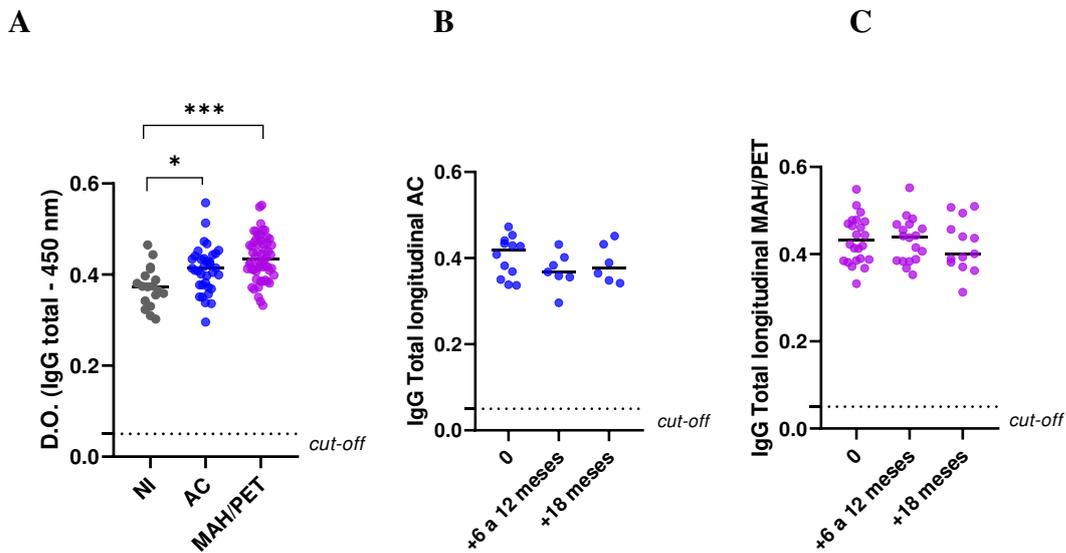
**Figura 17. Avaliação das subpopulações de neutrófilos encontrados no sangue periférico em pessoas vivendo com HTLV-1.** Avaliação das subpopulações de neutrófilos encontrados no sangue periférico em pessoas vivendo com HTLV-1 após marcação com um mix de anticorpos monoclonais contra moléculas encontradas em sua superfície. Foram analisadas células CD3<sup>neg</sup>CD19<sup>neg</sup>CD56<sup>neg</sup>CD14<sup>neg</sup>. (A) Gráfico das frequências de neutrófilos CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>. (B) Gráfico das frequências de neutrófilos CD16<sup>low</sup>CD62L<sup>+</sup>CXCR4<sup>+</sup>. (C) Gráfico das frequências de neutrófilos CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup>CXCR4<sup>+</sup>. Cada símbolo representa um indivíduo e a barra representa o valor das medianas de cada grupo.

A quimiocina CXCL8 (IL-8) que está relacionada a migração de neutrófilos (Powell, Lou, *et al.*, 2018), cujo receptor, o CXCR1, pode ser encontrado na superfície dos neutrófilos CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>. Os resultados preliminares sugerem haver pacientes MAH/PET com diferentes expressões desse receptor (**Figura 18A**).

Também se observou nos pacientes MAH/PET a presença de uma maior frequência de neutrófilos CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CD64<sup>+</sup> comparado aos pacientes AC (**Figura 18B**). O CD64 trata-se de um receptor para Fcγ e sua expressão nos neutrófilos pode estar associada à ativação destas células (Hoffmann, 2009).

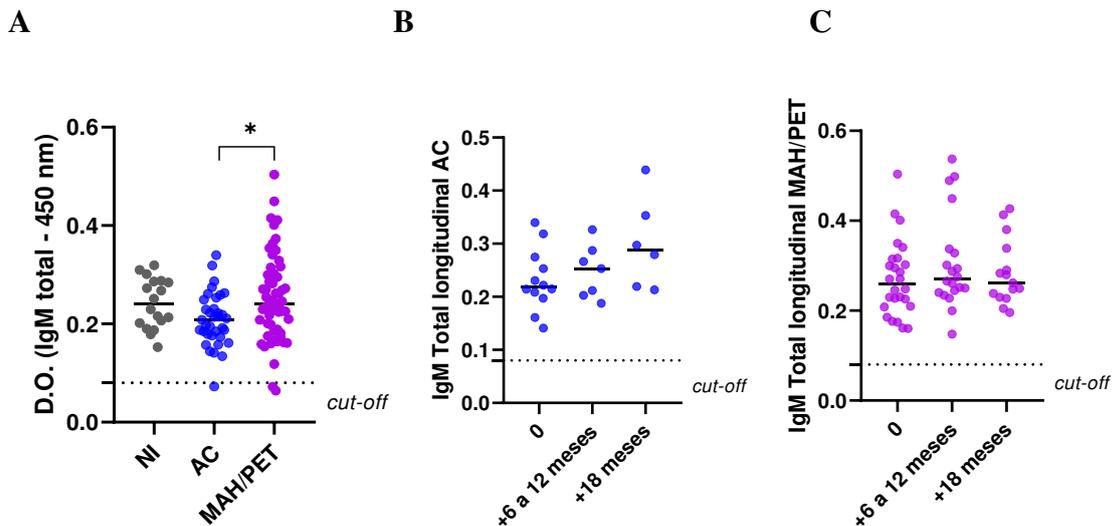
O receptor de quimiocina (CXCL12), o CXCR4<sup>+</sup> tem a sua expressão aumentada em neutrófilos senescentes, pois a sinalização via CXCR4 promove o retorno dos neutrófilos para a medula óssea, onde são eliminados (Eash, Means, *et al.*, 2009). Os resultados preliminares sugerem que neutrófilos CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> obtidos de pacientes AC e um grupo de indivíduos dentro dos MAH/PET tem maior frequência de células CXCR4<sup>+</sup> (**Figura 18C**).





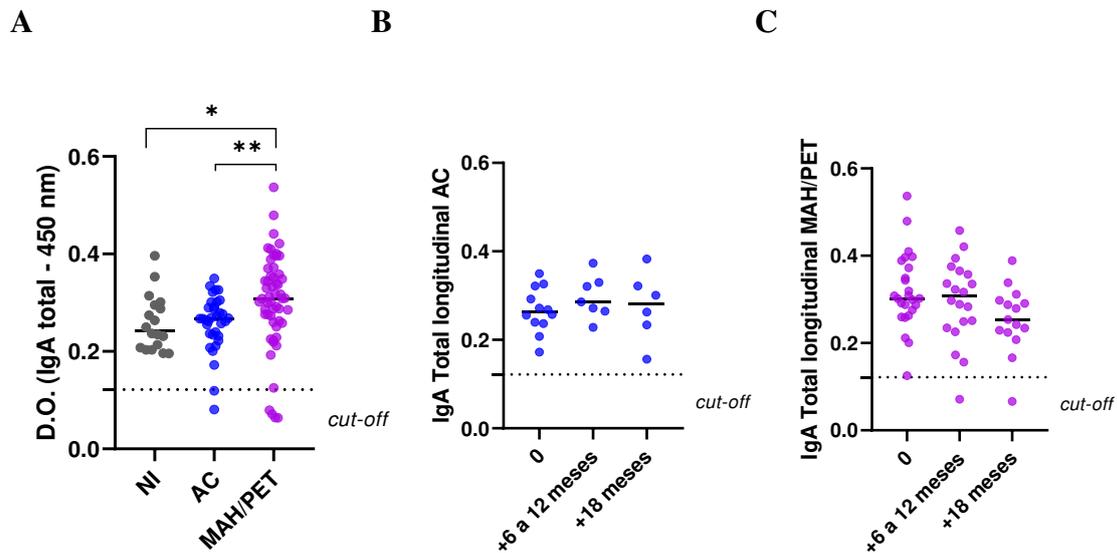
**Figura 19. Indivíduos MAH/PET e AC apresentam níveis aumentados de IgG total.** Avaliação dos níveis de IgG total, foram obtidos por ELISA a partir do soro (diluído 1:250) de indivíduos NI, AC e MAH/PET conforme descrito na metodologia. Na figura A está a análise de IgG total, em B a análise longitudinal do título de IgG total em pacientes AC e em C a análise longitudinal em indivíduos MAH/PET. Foram analisadas amostras coletadas no tempo zero (0) após o período entre +6 a 12 meses e +18 meses. Os símbolos representam o soro obtido de diferentes indivíduos. A linha tracejada indica o ponto de corte para amostras positivas. A linha – (preta) indica o valor da mediana de cada grupo. Os asteriscos representam o valor  $p < 0,05$ .

Foi feita também a avaliação dos níveis de IgM total em indivíduos NI, AC e MAH/PET. A IgM é uma imunoglobulina de fase aguda e age nos estágios iniciais da infecção por patógenos exógenos, geralmente. No entanto, não foram observadas diferenças entre indivíduos HTLV-1<sup>+</sup> e NI, contudo entre o grupo de pessoas vivendo com HTLV-1<sup>+</sup>, as pessoas acometidas pela MAH/PET tiveram níveis de IgM total maiores se comparados aos indivíduos assintomáticos (**Figura 20A**). Além disso, na análise longitudinal feita com indivíduos HTLV-1<sup>+</sup> nos tempos 0, +6-12 meses e +18 meses, não foram observadas variações nos níveis de IgM total ao longo do tempo, tanto para as pessoas assintomáticas (**Figura 20B**), quanto para os portadores da MAH/PET (**Figura 20C**).



**Figura 20. Indivíduos MAH/PET apresentam níveis aumentados de IgM total.** Avaliação dos níveis de IgM total, foram obtidos por ELISA a partir do soro (diluído 1:250) de indivíduos NI, AC e MAH/PET conforme descrito na metodologia. Na figura **A** está a análise de IgM total, em **B** a análise longitudinal do título de IgM total em pacientes AC e em **C** a análise longitudinal em indivíduos MAH/PET. Foram analisadas amostras coletadas no tempo zero (0) após o período entre +6 a 12 meses e +18 meses. Os símbolos representam o soro obtido de diferentes indivíduos. A linha tracejada indica o ponto de corte para amostras positivas. A linha – (preta) indica o valor da mediana de cada grupo. Os asteriscos representam o valor  $p < 0,05$ .

Também avaliou-se os títulos de IgA total em pessoas vivendo com HTLV-1 e indivíduos NI, já que esta imunoglobulina está presente na mucosa e está relacionada com a defesa do hospedeiro contra infecções exógenas, tais quais as causadas pela *S. aureus* e *E. coli*. Assim, foi observado que indivíduos MAH/PET possuem níveis elevados de IgA total se comparados tanto a indivíduos NI, quanto AC (**Figura 21A**). A análise longitudinal dos níveis de IgA total também foi feita utilizando as mesmas amostras nos tempos 0 (primeira coleta), após o período de +6 a 12 meses e +18 meses. Não foram observadas diferenças nos níveis de IgA total ao longo do tempo tanto em pessoas AC (**Figura 21B**) quanto aquelas portadoras da mielopatia associada ao HTLV-1 (**Figura 21C**).

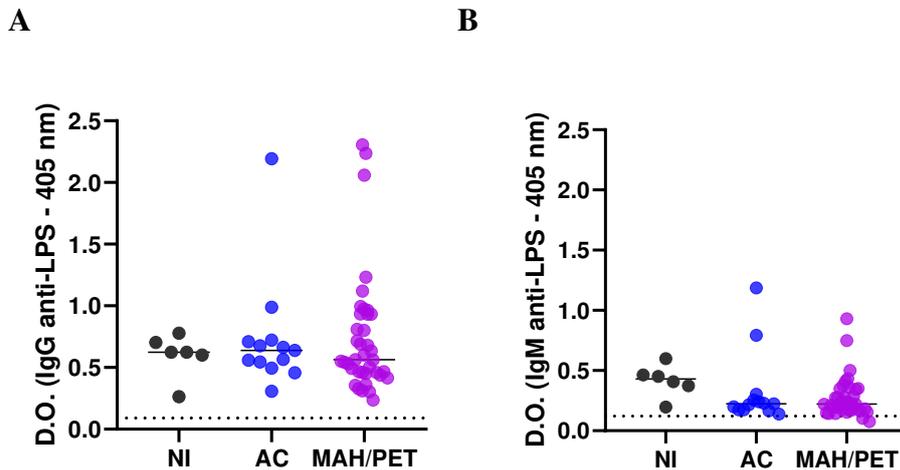


**Figura 21. Indivíduos MAH/PET apresentam níveis aumentados de IgA total.** Avaliação dos níveis de IgA total, foram obtidos por ELISA a partir do soro (diluído 1:100) de indivíduos NI, AC e MAH/PET conforme descrito na metodologia. Na figura A está a análise de IgA total, em B a análise longitudinal do título de IgA total em pacientes AC e em C a análise longitudinal em indivíduos MAH/PET. Foram analisadas amostras coletadas no tempo zero (0) após o período entre +6 a 12 meses e +18 meses. Os símbolos representam o soro obtido de diferentes indivíduos. A linha tracejada indica o ponto de corte para amostras positivas. A linha – (preta) indica o valor da mediana de cada grupo. Os asteriscos representam o valor  $p < 0,05$ .

### 5.5. Pessoas vivendo com HTLV-1 apresentam alterações nos níveis de IgG e IgM contra antígenos de bactérias Gram-negativas

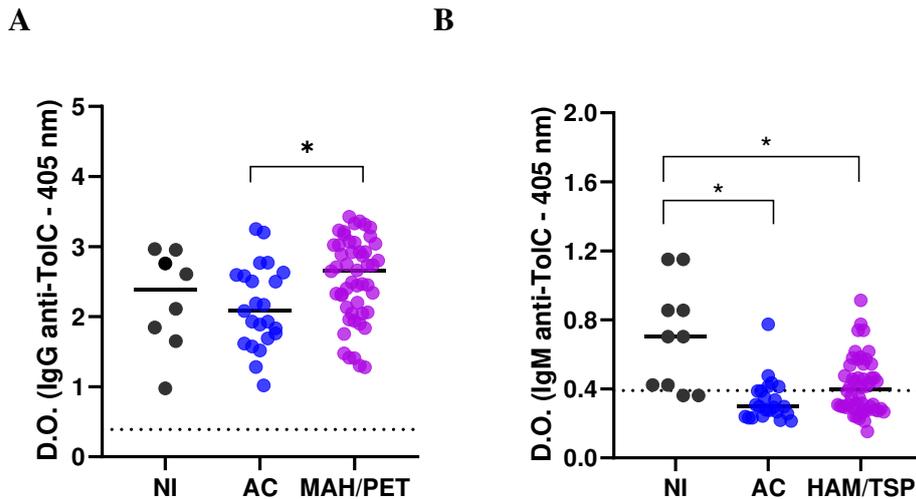
Foram realizados ensaios de ELISA para avaliar a presença de anticorpos do tipo IgM e IgG contra antígenos bacterianos em indivíduos MAH/PET, NI e AC para verificar se há alguma diferença nos níveis destes anticorpos que possam impactar na resposta imune. Sendo assim, foram verificados os níveis de anticorpos da classe IgG e IgM anti-LPS, lipopolissacarídeo presente na membrana de bactérias que age como fator de virulência e é capaz de induzir resposta inflamatória (Silhavy, Kahne e Walker, 2010). Os resultados dos níveis de IgG anti-LPS mostraram não haver nenhuma diferença entre os grupos avaliados (**Figura 22A**). Embora exista um grupo de pessoas vivendo com HTLV-1<sup>+</sup> (cerca de 38% dos indivíduos AC e MAH/PET) que possuem níveis elevados de IgG anti-LPS. Na **figura 22B** estão representados títulos níveis de IgM anti-LPS de indivíduos NI, AC e MAH/PET, mais uma vez não foi observada diferença significativa entre os grupos, apesar de haver uma tendência de diminuição dos níveis de IgM anti-LPS em parte das pessoas HTLV-1<sup>+</sup> (AC e MAH/PET) se comparados aos indivíduos NI. Por outro lado, na avaliação dos níveis de IgM

anti-LPS também foi encontrado um grupo de pessoas HTLV-1<sup>+</sup> que estão com a quantidade de imunoglobulina elevada, sugerindo um quadro de infecção aguda no período da coleta do sangue (**Figura 22B**).



**Figura 22. Pessoas vivendo com HTLV-1 apresentam níveis semelhantes de IgG e IgM contra LPS.** Avaliação da presença de IgG e IgM contra LPS no soro inativado (diluído 1:640) de indivíduos NI, AC e MAH/PET. **(A)** Níveis de IgG contra LPS no soro de indivíduos NI, AC e MAH/PET **(B)** Níveis de IgM contra LPS no soro de indivíduos NI, AC e MAH/PET. Os símbolos representam o soro obtido de diferentes indivíduos. A linha tracejada indica o ponto de corte para amostras positivas. A linha – (preta) indica o valor da mediana de cada grupo.

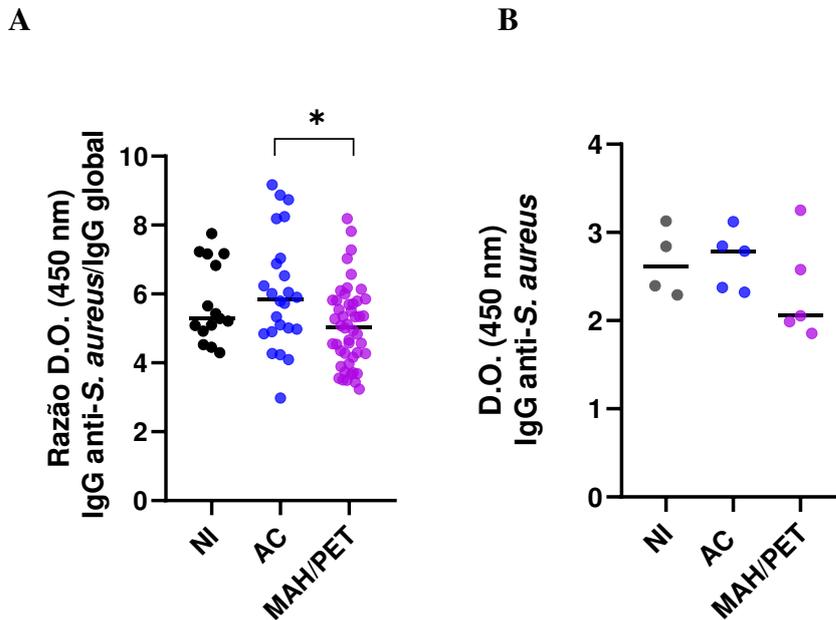
Também foi feita a avaliação do título de IgG e IgM anti-TolC, uma proteína que faz parte do complexo AcrAB-TolC, que é uma bomba de efluxo localizada na membrana das bactérias que está relacionada a um mecanismo de resistência a antibióticos e é muito conservada em bactérias Gram-negativas (BLAIR, RICHMOND, *et al.*, 2014). Na avaliação dos níveis de IgG anti-TolC, não vimos diferença entre os indivíduos NI e HTLV-1<sup>+</sup> (AC ou MAH/PET). Contudo os indivíduos MAH/PET apresentaram níveis aumentados de IgG anti-TolC se comparados a indivíduos AC (**Figura 23A**). Já em relação aos níveis de IgM, foi observada diferença significativa entre os indivíduos não infectados e os HTLV-1<sup>+</sup>, tanto MAH/PET quanto AC, estes apresentam níveis mais baixos do que o observado nos indivíduos não infectados (**Figura 23B**).



**Figura 23.** Pessoas vivendo com HTLV-1 apresentam alterações nos níveis de IgG e IgM anti-ToIC. Avaliação da presença de IgG e IgM contra a proteína ToIC no soro inativado (diluído 1:640) de indivíduos NI, AC e MAH/PET. (A) Níveis de IgG contra ToIC em soro de indivíduos NI, AC e MAH/PET (B) Níveis de IgM contra ToIC no soro de indivíduos NI, AC e MAH/PET. Os símbolos representam o soro obtido de diferentes indivíduos. A linha tracejada indica o ponto de corte para amostras positivas. A linha – (preta) indica o valor da mediana de cada grupo. Os asteriscos representam o valor  $p < 0,05$ .

### 5.6. Pacientes com MAH/PET apresentam menores níveis de IgG anti-*Staphylococcus aureus*

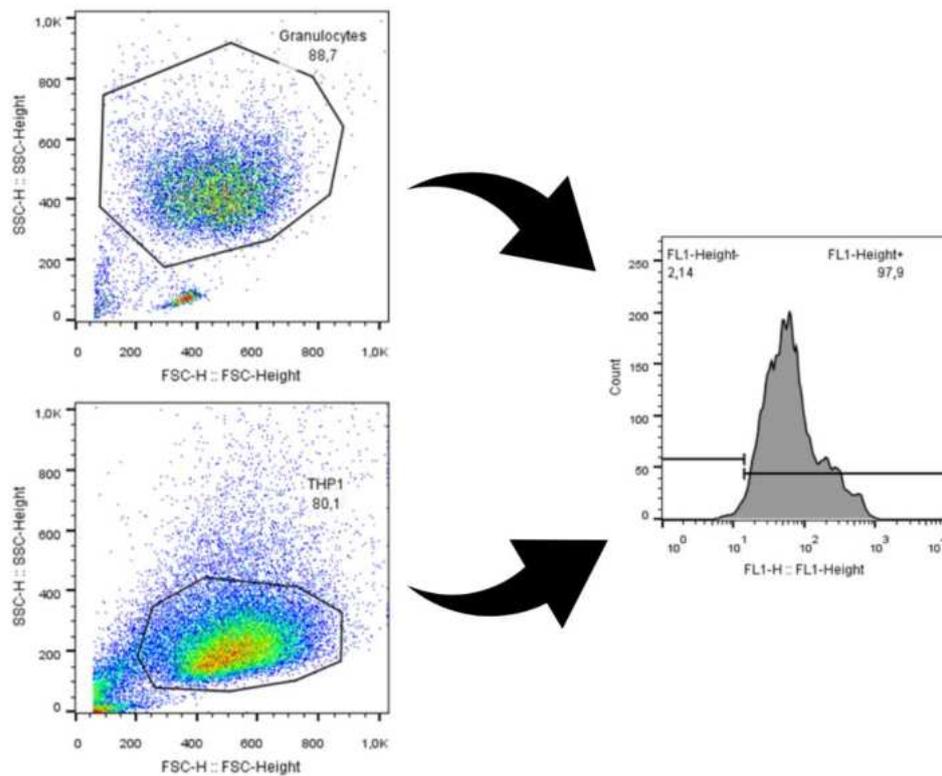
Foi feita a avaliação da presença de IgG anti-*Staphylococcus aureus*, utilizando um extrato de bactéria da linhagem ST30 (CR14-021). A ST30 é uma cepa representante de *S. aureus* associada com infecções de pele (Leme, Bispo e Salles, 2021). Para tal, foi realizada uma curva de diluição do soro inativado de indivíduos NI, AC e MAH/PET. Desse modo, não foi observado diferenças entre os níveis de IgG anti-*S. aureus* entre pacientes NI e HTLV-1<sup>+</sup>. Contudo, entre as pessoas vivendo com HTLV-1 foi observado uma redução nos níveis de IgG anti-*S. aureus* em portadores da MAH/PET se comparados aos indivíduos AC (**Figura 24A**). Como já citado na introdução deste trabalho (item 1.3.2.), a proteína A da *S. aureus* tem afinidade com a porção Fc da imunoglobulina, assim este fato pode impactar nos resultados por conta de ligações inespecíficas com a SpA. Um trabalho conduzido por Guidry e seu grupo (1991), sugeriu uma pré-incubação com soro para inibir as ligações inespecíficas entre a SpA e as Igs. Assim, adaptando a metodologia de proposta por Guidry e colaboradores, realizou-se uma pré-incubação com o soro de um indivíduo não infectado (diluído 1:250) como forma de bloqueio antes da adição das amostras da nossa coorte, diminuindo assim o aparecimento de ligações inespecíficas. Na **figura 24B** observou-se que os resultados preliminares indicam uma tendência de redução nos níveis de IgG anti-*S. aureus* nos pacientes com MAH/PET.



**Figura 24. Pessoas vivendo com HTLV-1 apresentam níveis detectáveis de IgG anti-ST30.** Avaliação dos níveis de IgG anti-*S. aureus*, os níveis de IgG foram obtidos por ELISA conforme descrito na metodologia. As amostras de soro foram diluídas de 1:50 até 1:25.600. Em (A) está representada a razão entre o somatório das D.O.'s obtidas para a IgG anti-*S. aureus* e a D.O. das IgGs totais. Em (B) está representado os resultados obtidos do ensaio de ELISA para detecção de IgG anti-*S. aureus* no qual uma etapa de pré-incubação com soro obtido de indivíduo não infectado adulto (1:250) para o bloqueio de ligações inespecíficas entre a porção Fc e a proteína SpA foi realizada. Os símbolos representam o soro obtido de diferentes indivíduos. Os asteriscos representam o valor de  $p < 0,05$ .

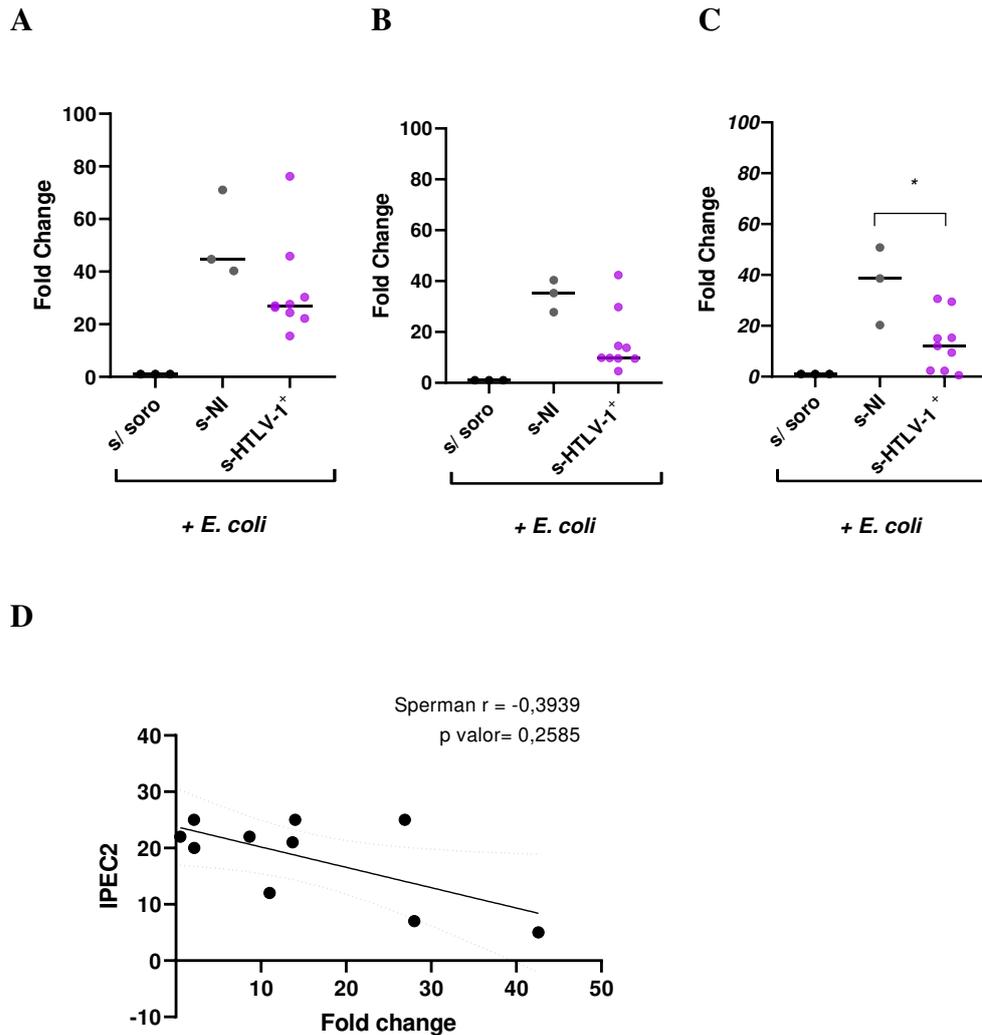
### 5.7. Pacientes HTLV-1<sup>+</sup> apresentam menor capacidade de opsonofagocitose do que indivíduos NI frente a *S. aureus* e *E. coli*

Para avaliar a capacidade de opsonofagocitose mediada por imunoglobulinas dos grupos estudados foram realizados ensaios de fagocitose, usando bactéria marcada com a sonda fluorescente (Syto9), e em seguida incubada com o soro do paciente em diferentes diluições. Posteriormente, a bactéria é incubada na presença de células fagocíticas e a fluorescência foi analisada por citometria de fluxo como descrito na metodologia (**Figura 25**).



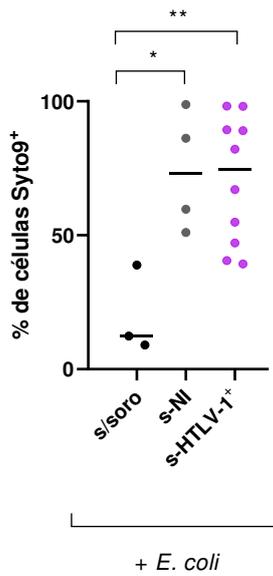
**Figura 25. Representação da estratégia de *gating* feita para a análise de fagocitose.** Foram selecionadas as populações de granulócitos ou de monócitos (THP1) baseadas nos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Essas populações foram avaliadas quanto ao percentual de células Syto9 positivas (bactérias fagocitadas ou adsorvidas na membrana celular).

A análise da opsonofagocitose com células da linhagem de monócitos (THP1) da bactéria *E. coli* com diferentes diluições do soro (1:20, 1:40 e 1:80), demonstrou que a opsonização da bactéria aumentou a capacidade fagocítica (**Figura 26A-C**). Entretanto, as bactérias opsonizadas com soro obtido de pacientes MAH/PET na diluição 1:80 do soro promoveu uma menor indução de fagocitose comparado à opsonização com soro de indivíduos não infectados (**Figura 26C**). Ao correlacionar os dados de fagocitose na diluição 1:80 com a escala EIPEC, que é uma escala utilizada para avaliar a progressão da MAH/PET em pessoas vivendo com HTLV-1 (quanto mais alto o *score*, maior comprometimento motor) encontrou-se uma correlação negativa entre estes dados (**Figura 26D**). Assim, quanto maior o comprometimento motor, menor foi a porcentagem de fagocitose, provavelmente indicando uma menor capacidade de opsonização das imunoglobulinas produzidas.



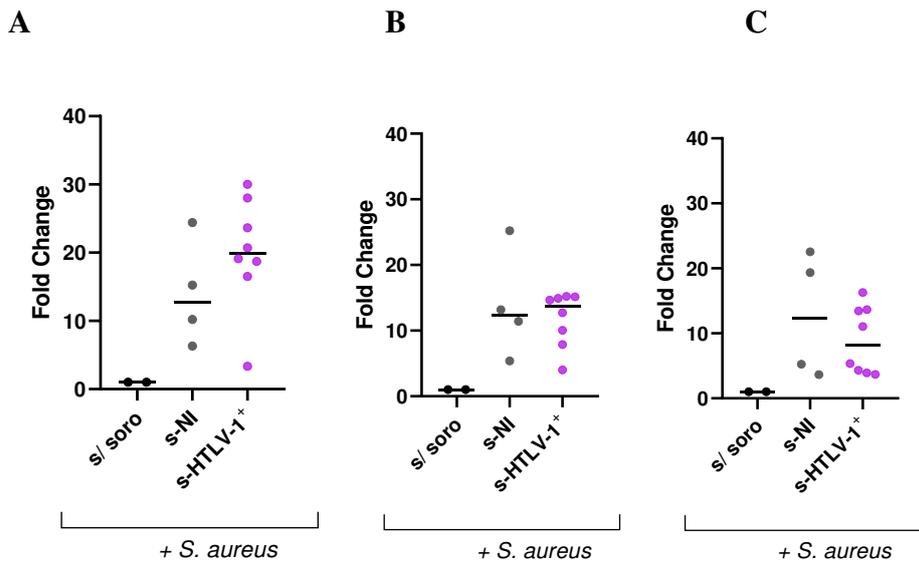
**Figura 26.** Soro de pacientes MAH/PET apresenta menor capacidade de induzir fagocitose. estão representados os resultados do experimento de fagocitose que foram normalizados e feitos com diferentes diluições do soro 1:20 (A), 1:40 (B), 1:80 (C). O gráfico representa o *fold change* entre a porcentagem de bactéria marcada com Syto9 e o controle sem soro é igual a 1. O asterisco representa o valor  $p < 0,05$ . (D) Correlação de Serman entre os resultados da opsonofagocitose com soro diluído 1:80 e a escala EIPEC-2, que é a escala de incapacidade neurológica do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (EIPEC-2).

O ensaio de fagocitose também foi realizado utilizando neutrófilos e a bactéria *E. coli*. Nesses resultados observamos que os neutrófilos apresentaram maior capacidade fagocítica na presença de soro comparado à ausência de adição de soro (Figura 27). Entretanto nestes resultados preliminares não foram encontradas diferenças entre os efeitos do soro obtido de pessoas vivendo com HTLV-1 e os indivíduos não infectados.



**Figura 27. Adição de soro aumentou a capacidade fagocítica de neutrófilos.** Representação dos resultados dos ensaios de Fagocitose com neutrófilos feitos com a diluição do soro de 1:20. Está plotado no gráfico a porcentagem de células marcadas com Syto9. O asterisco representa o valor  $p < 0,05$ .

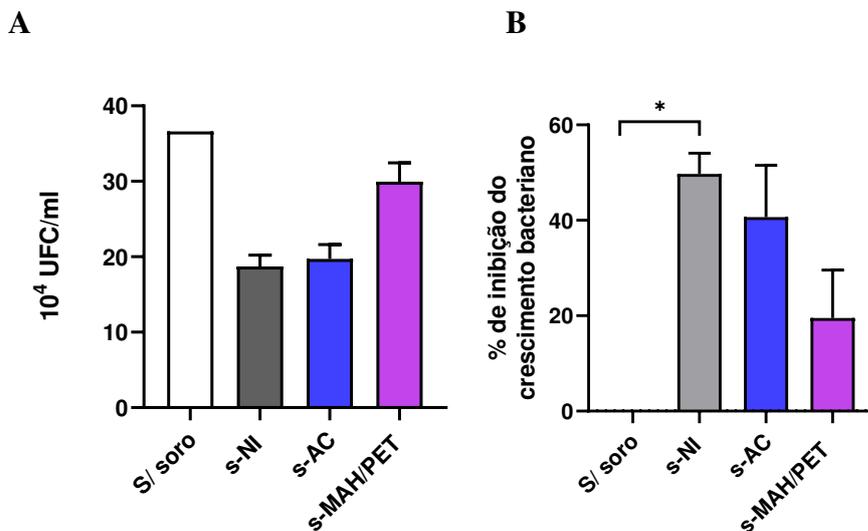
O ensaio de fagocitose também foi realizado com a bactéria *S. aureus*, seguindo o mesmo protocolo realizado com a bactéria *E. coli*. Em nossos resultados preliminares observou-se uma tendência a diminuição da capacidade de opsonofagocitose na presença de soro obtido de indivíduos HTLV-1<sup>+</sup> se comparados aos NI ao observamos na diluição 1:80 (**Figura 28A-C**).



**Figura 28. Soro de pacientes MAH/PET apresenta menor capacidade de induzir fagocitose.** Representação gráfica dos resultados do experimento de fagocitose que foram normalizados e feitos com diferentes diluições do soro 1:20 (A), 1:40 (B), 1:80 (C). O gráfico representa o *fold change* entre a porcentagem de células contendo a bactéria marcada com Syto9, no qual o controle sem soro é igual a 1.

### 5.8. Incubação com soro de indivíduos NI, AC e MAH/PET promove alteração da sobrevivência de *S. aureus*

A fim de comparar os efeitos do soro obtido de indivíduos NI, AC e MAH/PET sobre a sobrevivência de bactéria com a *S. aureus* utilizou-se células monocíticas THP1 conforme descrito na metodologia. Em nossos resultados preliminares, observamos que a adição de soro foi capaz de diminuir o crescimento bacteriano se comparado ao controle sem adição de soro (**Figura 29A**). Além disso, após avaliarmos a inibição do crescimento bacteriano, que considerou o controle sem soro como 100% de crescimento, observamos que a incubação com o soro de indivíduos NI promoveu uma maior inibição do crescimento bacteriano se comparados ao soro de pessoas HTLV-1<sup>+</sup>. Além disso, entre os portadores do vírus, os pacientes com MAH/PET tiveram uma menor capacidade de inibição do crescimento se comparados aos AC e aos NI (**Figura 29B**).



**Figura 29. Análise de sobrevivência da bactéria após incubação com soro NI, AC e MAH/PET.** Após incubação da bactéria *S. aureus* com soro de pacientes NI, AC e MAH/PET e posterior incubação com células THP1, o sobrenadante foi coletado e semeado em placas de Petri. Após incubação de 24 horas as colônias foram contadas. Em **A** está representado a média de contagem de colônias, cada barra colorida representa a incubação com um soro diferente, a barra sem cor representa o controle sem soro, onde há apenas presença da bactéria e a célula THP1. Em **B** está representada a porcentagem de inibição de crescimento, o controle sem soro foi considerado como 100% de crescimento bacteriano para fins de comparação. O asterisco representa o valor de  $p < 0,05$ .

## 6. Discussão

O presente estudo visa elucidar como se comporta a resposta antimicrobiana de pessoas vivendo com HTLV-1 frente a infecções bacterianas causadas por *E. coli* e *S. aureus*. Na literatura já foram relatados cerca de 16 quadros clínicos diferentes associados com a presença de HTLV-1, essas condições clínicas variam entre quadros de co-infecções com parasitos, vírus e uma maior recorrência de infecções de repetição causadas por bactérias (Rosadas, Taylor, 2022). Apesar de já ser comprovado a maior suscetibilidade de pacientes com HTLV-1 desenvolverem ITU de repetição e apresentarem lesões dermatológicas (Murphy, Wang, *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2005; La Grenade *et al.*, 1990; Okajima, Oliveira, *et al.*, 2013), os estudos na área são escassos e tem o foco principal no rastreamento de condições clínicas nestes pacientes, na maioria das vezes sem a identificação do agente causador da doença.

Apesar da escassez de dados, alguns estudos conseguiram determinar que, entre os pacientes HTLV-1<sup>+</sup>, o agente causador mais comum de lesões dermatológicas é a *S. aureus*, enquanto a *E. coli* está mais associada com as ITU's de repetição com que as pessoas vivendo com HTLV-1 sofrem de maneira rotineira (LaGrenade *et al.*, 1990; Maragno, Casseb, *et al.*, 2009; Cassar, Einsiedel, *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2005). Ademais, para os pacientes com MAH/PET que apresentam quadro de desabilidade motora, podendo ou não ter dependência no uso de cadeiras de rodas, e disfunção urinária, como por exemplo, quadro de bexiga neurogênica, casos de ITU podem ser mais frequentes e graves. Essas condições impactam na qualidade de vida dos indivíduos e podem levar a uma maior vulnerabilidade a infecções bacterianas, como Salameh, Mohajer e Daroucihe., 2015 destacou em seu trabalho sobre o impacto da ITU em pacientes com lesão medular. Em nossa coorte de estudo os pacientes tiveram o tratamento clínico para os sintomas, mas pela análise dos prontuários não tivemos acesso aos seus agentes etiológicos, que permaneceram na maioria vezes indeterminados com exceção de casos mais graves. Sendo assim, um dos objetivos deste estudo é chamar atenção para a recorrência desses casos em pessoas vivendo com HTLV-1 para que esse assunto quiçá receba mais atenção e seja investigado mais a fundo.

Quadros de lesões dermatológicas e ITU's de repetição, são comuns em nossa coorte, especialmente entre os indivíduos MAH/PET onde cerca de 27,3%, foram positivos para ambos os quadros. Apesar de não termos dados acerca dos agentes causadores dessas condições entre nossa população de estudo, a *S. aureus* e a *E. coli* foram escolhidas como modelos representativos segundo os dados na literatura, que apontam para a sua alta prevalência entre

peças vivendo com HTLV-1 e entre os indivíduos não infectados pelo vírus (Parlet, Brown e Horswill., 2019; Andrade, *et al.*, 2020; Flores-Mireles, Walker et al., 2015; Almeida, Simões e Raddi., 2007). Além disso, tanto a *E. coli* quanto a *S. aureus* são capazes de causar infecções em mucosas, sendo que a *E. coli* age na mucosa do trato urinário (Djojodimedjo, Soebadi, Soetjipto, 2013), enquanto a *S. aureus* pode ser encontrada na mucosa nasal (Liu, 2009).

Neste trabalho decidiu-se dar um enfoque sobre a resposta imune antimicrobiana mediada pelos anticorpos. Assim, para começarmos o nosso estudo nós fizemos a caracterização das subpopulações de células B entre os pacientes HTLV-1<sup>+</sup>, visto que as células B são precursoras de plasmablastos secretores de imunoglobulina. Em nossos resultados não observamos diferenças significativas entre as frequências de subpopulações em indivíduos AC se comparados aos MAH/PET, apesar de haver uma tendência a diminuição em algumas dessas subpopulações naqueles acometidos pela MAH/PET (Linfócitos B totais CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>, PC+PBCD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>, Linfócitos B *naive* IgD<sup>+</sup>CD27<sup>neg</sup> e Linfócitos B de memória imatura IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>). Ademais, ao comparar dados na literatura de análises de frequência de subpopulações de células B no sangue periférico de indivíduos saudáveis de acordo com a idade (coorte do Malawi, Mandala, Longwe, 2021) observa-se uma menor frequência de células nos pacientes HTLV-1<sup>+</sup>. Segundo Mandala e colaboradores (2021) a mediana da frequência de células B totais (CD19<sup>+</sup>) é de 11,24% (IQ<sub>10-90</sub> 4,86–19,40%) para pessoas acima de 60 anos, enquanto a frequência de células B totais (CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>) foi de 3,28% (IQ<sub>10-90</sub> 1,27-8,23%) para os pacientes AC e 1,95% (IQ<sub>10-90</sub> 0,06-4,95%) para os pacientes com MAH/PET. A avaliação de linfócitos B *naive* (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>neg</sup>) também evidenciou uma diferença entre as coortes, para Mandala e colaboradores (2021) a mediana obtida foi igual a 57,50% (IQ<sub>10-90</sub> 36,78–78,31%) para pessoas acima de 60 anos, enquanto nos nossos dados a mediana da frequência destas células é de 52,20 (IQ<sub>10-90</sub>41,90-70,30) para os indivíduos AC e 45,05% (IQ<sub>10-90</sub> 17,50-73,75%) para os pacientes com MAH/PET. Além disso, o grupo também mensurou a frequência de células B de memória (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), obteve-se uma mediana igual a 42,50% (IQ<sub>10-90</sub> 21,69–63,22%), enquanto que para os indivíduos AC a mediana da frequência observada foi igual 28,60% (IQ<sub>10-90</sub> 11,78-42,50%) e para os pacientes MAH/PET a mediana é igual a 13,65% (IQ<sub>10-90</sub> 6,66-43,82%). Sendo assim, pode-se sugerir que pessoas vivendo HTLV-1, especialmente com MAH/PET podem ter uma menor frequência de células B totais e subpopulações no sangue periférico, contudo esses são apenas resultados preliminares e seria preciso fazer a fenotipagem em indivíduos não infectados da nossa coorte para confirmar tais observações.

Também foi de interesse do nosso grupo realizar a fenotipagem de subpopulações de neutrófilos, visto que estas células são as primeiras a chegar no local de infecção e possuem a capacidade de fagocitose, seja pelo reconhecimento por meio de PRR's ou pela ligação a porção Fc de imunoglobulinas que opsonizaram a bactéria. Em nossos resultados preliminares, não foi observada diferença entre as subpopulações de neutrófilos maduros e imaturos. Contudo, segundo Eash, Means *et al.* (2009) a expressão de CXCR4 em neutrófilos CD16<sup>+</sup>CD62L<sup>low</sup> pode indicar estado de senescência. Em pacientes MAH/PET observa-se um grupo que apresenta uma alta frequência dessa população de neutrófilos senescentes (14,6% - 22,2%) quando comparada à frequência encontrada nos indivíduos AC (0,48 - 3,33%). Ademais, entre os neutrófilos, nossos resultados preliminares mostraram uma expressão aumentada de CXCR1 e CD64 em pacientes MAH/PET. A expressão de CD64 é baixa na superfície de neutrófilos obtidos de indivíduos saudáveis, mas sua expressão se eleva em algumas horas após infecções bacterianas, podendo aumentar cerca de 10 vezes e permitir diferenciar neutrófilos ativados e não ativados (Mortaz *et al.*, 2018). A expressão de CXCR1 também pode ser aumentada durante quadros infecciosos. Além disso, as ITU estão associadas ao recrutamento de neutrófilos para a mucosa do trato urinário através da interação entre o receptor CXCR1 e a quimiocina CXCL8, e ambos podem ser detectados na urina (Stillie *et al.*, 2009).

Por conseguinte, foi feita a avaliação dos níveis de imunoglobulina total das subpopulações de IgA, IgM e IgG em indivíduos NI e HTLV-1<sup>+</sup>. Desse modo, nossos resultados apontaram para um aumento nos níveis de IgG e IgA total em pessoas vivendo com HTLV-1<sup>+</sup> se comparados aos NI. Já para a IgM total, foi observado um aumento em portadores da MAH/PET se comparados aos AC. Assim, é importante frisar que portadores da MAH/PET são em sua maioria idosos, visto que é uma doença de caráter progressivo lento e o seu agente etiológico pode permanecer anos em estado de latência. Estudos apontam que pessoas idosas produzem um maior nível de imunoglobulina total, em especial aqueles dos isotipos IgG e IgA, e apresentam uma redução sutil do nível de IgM reduzindo após chegar na faixa de 40 a 59 anos (Blanco, Perez-Andres, *et al.*, 2018). Devido a equivalência entre a faixa etária de indivíduos NI e HTLV-1<sup>+</sup>, sugerimos que a idade provavelmente não é um fator impactante neste aumento da IgG total observada nos indivíduos HTLV-1<sup>+</sup>. Esses resultados corroboram dados na literatura que apontam para quadros de hipergamaglobulinemia em pacientes HTLV-1<sup>+</sup> (Belec, Georges, *et al.*, 1996). A hipergamaglobulinemia pode ser resultado de infecções virais e é caracterizada pelo nível elevado de imunoglobulinas no sangue, assim causando um desequilíbrio na resposta imune (Snyder, 2018). Portanto, o aumento do nível de Ig nesses

pacientes provavelmente se correlaciona mais com a exposição crônica ao vírus, além de outros a patógenos aos quais as pessoas HTLV-1<sup>+</sup> apresentam maior susceptibilidade. Na análise longitudinal dos níveis de IgG, IgM e IgA total em pessoas HTLV-1<sup>+</sup>, não foram observadas variações do nível de Ig ao longo do período.

Foram feitas também avaliações de IgG e IgM contra antígenos de bactérias Gram-negativas (LPS e TolC) e IgG anti-*S. aureus*. Entretanto, não foram observadas diferenças entre os indivíduos NI e HTLV-1<sup>+</sup> em relação a Ig anti-LPS. Já em relação a proteína TolC, foi observado um aumento de IgG anti-TolC em pacientes MAH/PET se comparados aos pacientes AC, enquanto a IgM anti-TolC mostrou uma redução no nível de anticorpos em pacientes HTLV-1<sup>+</sup> se comparados aos NI. Desse modo, o aumento no nível de IgG provavelmente se relaciona com o fato de pessoas MAH/PET serem mais afetadas pelas ITU's de repetição se comparados aos indivíduos assintomáticos, já a redução no nível de IgM pode-se apontar para uma resposta aguda deficiente, o que provavelmente corrobora com dificuldades em resolver a infecção e a persistência do patógeno no organismo.

Já em relação a avaliação do nível de IgG anti-*S. aureus*, foi observado um aumento no nível dessa Ig em pacientes AC se comparados aos MAH/PET. Assim, esse é um resultado que corrobora o fato das pessoas com MAH/PET apresentarem maior susceptibilidade a lesões dermatológicas infecciosas. Contudo, também é válido ressaltar que nesse experimento foi utilizada a bactéria inteira lisada num tampão, então os antígenos que cobrem a placa também contêm peptidoglicano e outras estruturas que são comuns a todas as bactérias Gram-positivas e não só a *S. aureus* (Silhavy, Kahne e Walker, S. 2010). Além disso, a *S. aureus* possui em sua parede celular a proteína A, que é uma estrutura particular da bactéria com afinidade pela porção Fc de imunoglobulinas. Essa característica pode promover o aparecimento de ligações inespecíficas em ensaios de ELISA. Logo, Guidry e seu grupo (1991) desenvolveram uma estratégia para diminuir essas ligações inespecíficas em metodologias de ELISA. Nosso grupo conduziu um ensaio piloto baseado na metodologia proposta por Guidry *et al.* (1991), usando uma pré-incubação com o soro humano para reduzir as ligações inespecíficas. Os resultados que obtivemos ao utilizar essa metodologia foram promissores e similares aos encontrados após normalizar os ensaios de ELISA anti-*S. aureus* com os resultados de imunoglobulina total, contudo o número de amostras nesse experimento ainda é muito pequeno e serão necessários mais experimentos para confirmar os achados.

Para avaliar as atividades mediadas por imunoglobulinas de indivíduos HTLV-1<sup>+</sup> e NI realizamos ensaios de sobrevivência de bactéria e de opsonofagocitose. Desse modo, nos ensaios de opsonofagocitose, que foram realizados com a *S. aureus* e a *E. coli* e com duas diferentes células fagocíticas (neutrófilo de doadores NI e linhagem de monócitos THP1), foi observado que a adição do soro induziu a maior fagocitose da *E. coli* nos dois tipos celulares. Ademais, para os experimentos com a linhagem de monócitos foi realizada uma curva de diluição do soro (1:20, 1:40 e 1:80) e na maior diluição foi observado que a incubação com o soro de indivíduos HTLV-1<sup>+</sup> induz menor capacidade fagocítica se comparado a incubação com o soro de indivíduos NI. Além disso, uma hipótese a ser levantada é que as Ig desses pacientes podem ter uma maior classe de isotipos menos eficientes na função de opsonização, como os isotipos IgG2 e IgG4 (Fleming, Castro-Dopico, e Clatworthy., 2022). Também observa-se que existe uma correlação negativa entre a escala EIPEC-2 e a fagocitose de *E. coli* em pacientes HTLV-1<sup>+</sup>, assim quanto maior o *score* EIPEC, ou seja, quanto maior o comprometimento neurológico, menor capacidade de opsonofagocitose essa pessoa apresenta, sugerindo que quanto maior a desabilidade motora, mais difícil é a resolução de infecção e assim acarretando uma maior vulnerabilidade a infecções oportunistas.

Já para a opsonofagocitose de *S. aureus* não foram observadas diferenças significativas. Entretanto, nos ensaios de sobrevivência de bactéria realizados com a *S. aureus*, a adição de soro foi capaz de diminuir o crescimento bacteriano. Mas, apenas a incubação com o soro NI foi capaz de inibir significativamente a expansão de bactérias, enquanto a incubação com o soro de indivíduos MAH/PET apresentou a menor capacidade de inibição de crescimento. Esse resultado se correlaciona com o menor nível de IgG anti-*S. aureus* e sugere algum tipo de alteração dessas imunoglobulinas que implique na menor eficiência na ativação de citotoxicidade dependente de anticorpo.

Em conjunto, nossos dados sugerem que pacientes HTLV-1<sup>+</sup> apresentam diferenças importantes na produção de imunoglobulinas que podem impactar diretamente no controle de infecções bacterianas oportunistas.

## 7. Conclusões

Em conjunto, nossos resultados demonstram que pessoas vivendo com HTLV-1 possuem alterações na sua resposta imune antimicrobiana que podem levar a um quadro de maior vulnerabilidade a coinfeção com patógenos e dificuldade na resolução de infecções

bacterianas. Sendo assim, os indivíduos HTLV-1<sup>+</sup> possuem maior nível de IgA e IgG totais se comparado a pessoas não infectadas. Ademais, pessoas vivendo com HTLV-1 também possuem uma variação no nível de imunoglobulinas específicas para o antígeno bacteriano de Gram-negativas, TolC, como o aumento de IgG anti-TolC em portadores de MAH/PET se comparado aos AC.

Apesar do nível de IgG anti-TolC aumentado, em nossos experimentos funcionais a incubação com o plasma de pessoas HTLV-1<sup>+</sup> apresentou menor capacidade de opsonofagocitose se comparada a incubação com o plasma de pessoas NI.

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas na opsonofagocitose de *S. aureus* o soro de pessoas vivendo com HTLV-1, especialmente com MAH/PET, não reduziu significativamente o crescimento bacteriano.

## 8. Referências bibliográficas

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S. (2019) Cellular and Molecular Immunology. 9th Edition, (Elsevier Saunders, Philadelphia) pp 275-281.
- Alais, S., Mahieux, R., & Dutartre, H. (2015). Viral Source-Independent High Susceptibility of Dendritic Cells to Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection Compared to That of T Lymphocytes. *Journal of virology*, 89(20), 10580–10590.
- Almeida, M., Simões, Raddi. (2007) "Ocorrência de infecção urinária em pacientes de um hospital universitário", *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl*, n. 2, p. 215–219.
- Andersen-Nissen, E., Hawn, T. R., Smith, K. D., Nachman, A., Lampano, A. E., Uematsu, S., Akira, S., & Aderem, A. (2007). Cutting edge: Tlr5<sup>-/-</sup> mice are more susceptible to *Escherichia coli* urinary tract infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 178(8), 4717–4720.
- Ando, H., Sato, T., Tomaru, U., Yoshida, M., Utsunomiya, A., Yamauchi, J., Araya, N., Yagishita, N., Coler-Reilly, A., Shimizu, Y., Yudoh, K., Hasegawa, Y., Nishioka, K., Nakajima, T., Jacobson, S., & Yamano, Y. (2013). Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain: a journal of neurology*, 136(Pt 9), 2876–2887.
- Andrade, M. M., Luiz, W. B., da Silva Oliveira Souza, R., & Amorim, J. H. (2020). The History of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Brazil. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology = Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale*, 2020, 1721936.
- Araujo, A., Bangham, C. R. M., Casseb, J., Gotuzzo, E., Jacobson, S., Martin, F., Penalva de Oliveira, A., Puccioni-Sohler, M., Taylor, G. P., & Yamano, Y. (2021). Management of

HAM/TSP: Systematic Review and Consensus-based Recommendations 2019. *Neurology. Clinical practice*, 11(1), 49–56.

Araya, N., Sato, T., Ando, H., Tomaru, U., Yoshida, M., Coler-Reilly, A., Yagishita, N., Yamauchi, J., Hasegawa, A., Kannagi, M., Hasegawa, Y., Takahashi, K., Kunitomo, Y., Tanaka, Y., Nakajima, T., Nishioka, K., Utsunomiya, A., Jacobson, S., & Yamano, Y. (2014). HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells. *The Journal of clinical investigation*, 124(8), 3431–3442.

Arimura, K., Nakagawa, M., Izumo, S., Usuku, K., Itoyama, Y., Kira, J., & Osame, M. (2007). Safety and efficacy of interferon-alpha in 167 patients with human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy. *Journal of neurovirology*, 13(4), 364–372.

Bäckhed, F., Söderhäll, M., Ekman, P., Normark, S., & Richter-Dahlfors, A. (2001). Induction of innate immune responses by *Escherichia coli* and purified lipopolysaccharide correlate with organ- and cell-specific expression of Toll-like receptors within the human urinary tract. *Cellular microbiology*, 3(3), 153–158.

Bangham, C. R., Araujo, A., Yamano, Y., & Taylor, G. P. (2015). HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nature reviews. Disease primers*, 1, 15012.

Barnard, A. L., Igakura, T., Tanaka, Y., Taylor, G. P., & Bangham, C. R. (2005). Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood*, 106(3), 988–995.

Belec, L., Jean Georges, A., Hallouin, M. C., Si Mohamed, A., Morand-Joubert, L., & Georges-Courbot, M. C. (1996). Human T-lymphotropic virus type I excretion and specific antibody response in paired saliva and cervicovaginal secretions. *AIDS research and human retroviruses*, 12(2), 157–167.

Bittencourt, A. L., & Maria. (2005). Dermatite infecciosa associada ao HTLV-I (DIH) infante-juvenil e do adulto. 80(suppl 3), S364–S369.

Blair, J. M., Richmond, G. E., & Piddock, L. J. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future microbiology*, 9(10), 1165–1177.

Blanco, E., Pérez-Andrés, M., Arriba-Méndez, S., Contreras-Sanfeliciano, T., Criado, I., Pelak, O., Serra-Caetano, A., Romero, A., Puig, N., Remesal, A., Torres Canizales, J., López-Granados, E., Kalina, T., Sousa, A. E., van Zelm, M., van der Burg, M., van Dongen, J. J. M., Orfao, A., & EuroFlow PID group (2018). Age-associated distribution of normal B-cell and plasma cell subsets in peripheral blood. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 141(6), 2208–2219.e16.

Bravo F. G. (2020). Infective dermatites: A purely cutaneous manifestation of HTLV-1 infection. *Seminars in diagnostic pathology*, 37(2), 92–97.

Breijyeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(6), 1340.

Brites, C., Grassi, M. F., Quaresma, J. A. S., Ishak, R., & Vallinoto, A. C. R. (2021). Pathogenesis of HTLV-1 infection and progression biomarkers: An overview. *The Brazilian*

journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases, 25(3), 101594.

Carneiro-Proietti, A. B., Sabino, E. C., Leão, S., Salles, N. A., Loureiro, P., Sarr, M., Wright, D., Busch, M., Proietti, F. A., Murphy, E. L., & NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (Reds-II), International Component (2012). Human T-lymphotropic virus type 1 and type 2 seroprevalence, incidence, and residual transfusion risk among blood donors in Brazil during 2007-2009. *AIDS research and human retroviruses*, 28(10), 1265–1272.

Cassar, O., Einsiedel, L., Afonso, P. V., & Gessain, A. (2013). Human T-cell lymphotropic virus type 1 subtype C molecular variants among indigenous australians: new insights into the molecular epidemiology of HTLV-1 in Australo-Melanesia. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(9), e2418.

Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547–569.

Chevalier, S. A., Turpin, J., Cachat, A., Afonso, P. V., Gessain, A., Brady, J. N., Pise-Masison, C. A., & Mahieux, R. (2014). Gem-induced cytoskeleton remodeling increases cellular migration of HTLV-1-infected cells, formation of infected-to-target T-cell conjugates and viral transmission. *PLoS pathogens*, 10(2), e1003917.

Coler-Reilly, A. L., Yagishita, N., Suzuki, H., Sato, T., Araya, N., Inoue, E., Takata, A., & Yamano, Y. (2016). Nation-wide epidemiological study of Japanese patients with rare viral myelopathy using novel registration system (HAM-net). *Orphanet journal of rare diseases*, 11(1), 69.

Deshpande, O. A., & Wadhwa, R. (2022). Phagocytosis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. Nih.gov Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32310503/>.

Dixon, A. C., Yanagihara, E. T., Kwock, D. W., & Nakamura, J. M. (1989). Strongyloidiasis associated with human T-cell lymphotropic virus type I infection in a nonendemic area. *The Western journal of medicine*, 151(4), 410–413.

Djojodimedjo, T., Soebadi, D. M., & Soetjipto (2013). *Escherichia coli* infection induces mucosal damage and expression of proteins promoting urinary stone formation. *Urolithiasis*, 41(4), 295–301.

Dörner, T., & Radbruch, A. (2007). Antibodies and B cell memory in viral immunity. *Immunity*, 27(3), 384–392.

Eash, K. J., Means, J. M., White, D. W., & Link, D. C. (2009). CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood*, 113(19), 4711–4719.

Enose-Akahata, Y., Azodi, S., Smith, B. R., Billioux, B. J., Vellucci, A., Ngouth, N., Tanaka, Y., Ohayon, J., Cortese, I., Nath, A., & Jacobson, S. (2018). Immunophenotypic characterization of CSF B cells in virus-associated neuroinflammatory diseases. *PLoS pathogens*, 14(4), e1007042.

Ernzen, K. J., & Panfil, A. R. (2022). Regulation of HTLV-1 transformation. *Bioscience reports*, 42(3), BSR20211921.

- Espinoza, V. E., & Emmady, P. D. (2023). Histology, Monocytes. In StatPearls. StatPearls Publishing. Nih.gov Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32491550/>.
- Eusebio-Ponce, E., Anguita, E., Paulino-Ramirez, R., & Candel, F. J. (2019). HTLV-1 infection: An emerging risk. Pathogenesis, epidemiology, diagnosis and associated diseases. *Revista española de quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*, 32(6), 485–496.
- Eusebio-Ponce, E., Candel, F. J., & Anguita, E. (2019). Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 and associated diseases in Latin America. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, 24(8), 934–953.
- Fleming, A. F., Maharajan, R., Abraham, M., Kulkarni, A. G., Bhusnurmath, S. R., Okpara, R. A., Williams, E., Akinsete, I., Schneider, J., & Bayer, H. (1986). Antibodies to HTLV-I in Nigerian blood-donors, their relatives and patients with leukaemias, lymphomas and other diseases. *International journal of cancer*, 38(6), 809–813.
- Fleming, A., Castro-Dopico, T., & Clatworthy, M. R. (2022). B cell class switching in intestinal immunity in health and disease. *Scandinavian journal of immunology*, 95(2), e13139.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews. Microbiology*, 13(5), 269–284.
- Fujisawa, Ji. (2017). Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1). *Adult T-cell Leukemia/Lymphoma*. Springer, p. 3–31.
- Fukumoto, R., Andresen, V., Bialuk, I., Cecchinato, V., Walser, J. C., Valeri, V. W., Nauroth, J. M., Gessain, A., Nicot, C., & Franchini, G. (2009). In vivo genetic mutations define predominant functions of the human T-cell leukemia/lymphoma virus p12I protein. *Blood*, 113(16), 3726–3734.
- Fuzii, H. T., da Silva Dias, G. A., de Barros, R. J., Falcão, L. F., & Quaresma, J. A. (2014). Immunopathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Life sciences*, 104(1-2), 9–14.
- Gallo R. C. (2011). Research and discovery of the first human cancer virus, HTLV-1. *Best practice & research. Clinical haematology*, 24(4), 559–565.
- Gerdes, H. H., Bukoreshtliev, N. V., & Barroso, J. F. (2007). Tunneling nanotubes: a new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS letters*, 581(11), 2194–2201.
- Gessain, A., & Cassar, O. (2012). Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Frontiers in microbiology*, 3, 388.
- Gessain, A., Barin, F., Vernant, J. C., Gout, O., Maurs, L., Calender, A., & de Thé, G. (1985). Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet (London, England)*, 2(8452), 407–410.
- Gessain, A., Saal, F., Gout, O., Daniel, M. T., Flandrin, G., de The, G., Peries, J., & Sigaux, F. (1990). High human T-cell lymphotropic virus type I proviral DNA load with polyclonal

integration in peripheral blood mononuclear cells of French West Indian, Guianese, and African patients with tropical spastic paraparesis. *Blood*, 75(2), 428–433.

Ghez, D., Lepelletier, Y., Jones, K. S., Pique, C., & Hermine, O. (2010). Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. *Retrovirology*, 7, 99.

Gonçalves, D. U., Proietti, F. A., Ribas, J. G., Araújo, M. G., Pinheiro, S. R., Guedes, A. C., & Carneiro-Proietti, A. B. (2010). Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clinical microbiology reviews*, 23(3), 577–589.

Goon, P. K., & Bangham, C. R. (2004). Interference with immune function by HTLV-1. *Clinical and experimental immunology*, 137(2), 234–236.

Goon, P. K., Hanon, E., Igakura, T., Tanaka, Y., Weber, J. N., Taylor, G. P., & Bangham, C. R. (2002). 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*, 99(9), 3335–3341.

Grassi, M. F., Dos Santos, N. P., Lírio, M., Kritski, A. L., Chagas Almeida, M.daC., Santana, L. P., Lázaro, N., Dias, J., Netto, E. M., & Galvão-Castro, B. (2016). Tuberculosis incidence in a cohort of individuals infected with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) in Salvador, Brazil. *BMC infectious diseases*, 16, 491.

Gross, C., & Thoma-Kress, A. K. (2016). Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. *Viruses*, 8(3), 74.

Guidry, A. J., Squiggins, K. E., Vann, W. F., & Westhoff, D. C. (1991). Prevention of nonspecific binding of immunoglobulin to *Staphylococcus aureus* protein A in ELISA assays. *Journal of immunological methods*, 143(2), 159–165.

Hoffmann J. J. (2009). Neutrophil CD64: a diagnostic marker for infection and sepsis. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 47(8), 903–916.

Hoshino H. (2012). Cellular Factors Involved in HTLV-1 Entry and Pathogenicity. *Frontiers in microbiology*, 3, 222.

Igakura, T., Stinchcombe, J. C., Goon, P. K., Taylor, G. P., Weber, J. N., Griffiths, G. M., Tanaka, Y., Osame, M., & Bangham, C. R. (2003). Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5613), 1713–1716.

Iijima, N., Yamauchi, J., Yagishita, N., Araya, N., Aratani, S., Tanabe, K., Sato, T., Takata, A., & Yamano, Y. (2021). Clinical course of neurogenic bladder dysfunction in human T-cell leukemia virus type-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: a nationwide registry study in Japan. *Orphanet journal of rare diseases*, 16(1), 355.

Jacobson, S., Shida, H., McFarlin, D. E., Fauci, A. S., & Koenig, S. (1990). Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature*, 348(6298), 245–248.

Jaillon, S., Ponzetta, A., Di Mitri, D., Santoni, A., Bonecchi, R., & Mantovani, A. (2020). Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy. *Nature reviews. Cancer*, 20(9), 485–503.

- Jeannel, D., Garin, B., Kazadi, K., Singa, L., & de Thé, G. (1993). The risk of tropical spastic paraparesis differs according to ethnic group among HTLV-I carriers in Inongo, Zaire. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, 6(7), 840–844.
- Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y. K., Bertolette, D. C., & Ruscetti, F. W. (2008). Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nature medicine*, 14(4), 429–436.
- Justiz Vaillant, A. A., Jamal, Z., Patel, P., & Ramphul, K. (2023). Immunoglobulin. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. Nih.gov Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513460/>.
- Kalinichenko, S., Komkov, D., & Mazurov, D. (2022). HIV-1 and HTLV-1 Transmission Modes: Mechanisms and Importance for Virus Spread. *Viruses*, 14(1), 152.
- Kaplan, J. E., Osame, M., Kubota, H., Igata, A., Nishitani, H., Maeda, Y., Khabbaz, R. F., & Janssen, R. S. (1990). The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*, 3(11), 1096–1101.
- King, H. W., Orban, N., Riches, J. C., Clear, A. J., Warnes, G., Teichmann, S. A., & James, L. K. (2021). Single-cell analysis of human B cell maturation predicts how antibody class switching shapes selection dynamics. *Science immunology*, 6(56), eabe6291.
- Kitajima, I., Yamamoto, K., Sato, K., Nakajima, Y., Nakajima, T., Maruyama, I., Osame, M., & Nishioka, K. (1991). Detection of human T cell lymphotropic virus type I proviral DNA and its gene expression in synovial cells in chronic inflammatory arthropathy. *The Journal of clinical investigation*, 88(4), 1315–1322.
- Kobayashi, S. D., DeLeo, F. R. (2013). Staphylococcus aureus protein A promotes immune suppression. *mBio*, 4(5), e00764-13.
- Kowada A. (2023). Cost-effectiveness of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) antenatal screening for prevention of mother-to-child transmission. *PLoS neglected tropical diseases*, 17(2).
- Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J., Iwamasa, T., Goto, I., & Yamamoto, N. (1993). In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*, 196(1), 25–33.
- Krishna, S., & Miller, L. S. (2012). Innate and adaptive immune responses against Staphylococcus aureus skin infections. *Seminars in immunopathology*, 34(2), 261–280.
- Küppers R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nature reviews. Immunology*, 3(10), 801–812.
- La Grenade, L., Manns, A., Fletcher, V., Derm, D., Carberry, C., Hanchard, B., Maloney, E. M., Cranston, B., Williams, N. P., Wilks, R., Kang, E. C., & Blattner, W. A. (1998). Clinical, pathologic, and immunologic features of human T-lymphotrophic virus type I-associated infective dermatitis in children. *Archives of dermatology*, 134(4), 439–444.
- LaGrenade, L., Hanchard, B., Fletcher, V., Cranston, B., & Blattner, W. (1990). Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet (London, England)*, 336(8727), 1345–1347.

- Lehky, T. J., Fox, C. H., Koenig, S., Levin, M. C., Flerlage, N., Izumo, S., Sato, E., Raine, C. S., Osame, M., & Jacobson, S. (1995). Detection of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by in situ hybridization. *Annals of neurology*, 37(2), 167–175.
- Leme, R. C. P., Bispo, P. J. M., & Salles, M. J. (2021). Community-genotype methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in Latin America: a systematic review. *The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 25(1), 101539.
- Lepoutre, V., Jain, P., Quann, K., Wigdahl, B., & Khan, Z. K. (2009). Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 14(3), 1152–1168.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews. Immunology*, 7(9), 678–689.
- Lima, M. A., Bica, R. B., & Araújo, A. Q. (2005). Gender influence on the progression of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 76(2), 294–296.
- Liu G. Y. (2009). Molecular pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatric research*, 65(5 Pt 2), 71R–77R.
- Maali, Y., Journo, C., Mahieux, R., & Dutartre, H. (2020). Microbial Biofilms: Human T-cell Leukemia Virus Type 1 First in Line for Viral Biofilm but Far Behind Bacterial Biofilms. *Frontiers in microbiology*, 11, 2041.
- Mahieux, R., & Gessain, A. (2009). The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: new members of the HTLV family. *Pathologie-biologie*, 57(2), 161–166.
- Mandala, W. L., & Longwe, H. (2021). Variation of B cell subsets with age in healthy Malawians. *PloS one*, 16(7), e0254320.
- Maragno, L., Casseb, J., Fukumori, L. M., Sotto, M. N., Duarte, A. J., Festa-Neto, C., & Sanches, J. A. (2009). Human T-cell lymphotropic virus type 1 infective dermatitis emerging in adulthood. *International journal of dermatology*, 48(7), 723–730.
- Marcusso, R. M. N., Van Weyenbergh, J., de Moura, J. V. L., Dahy, F. E., de Moura Brasil Matos, A., Haziot, M. E. J., Vidal, J. E., Fonseca, L. A. M., Smid, J., Assone, T., Casseb, J., & de Oliveira, A. C. P. (2019). Dichotomy in Fatal Outcomes in a Large Cohort of People Living with HTLV-1 in São Paulo, Brazil. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(1), 25.
- Martin, J. L., Maldonado, J. O., Mueller, J. D., Zhang, W., & Mansky, L. M. (2016). Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. *Viruses*, 8(2), 31.
- Martin-Latil, S., Gnädig, N. F., Mallet, A., Desdouts, M., Guivel-Benhassine, F., Jeannin, P., Prevost, M. C., Schwartz, O., Gessain, A., Ozden, S., & Ceccaldi, P. E. (2012). Transcytosis of HTLV-1 across a tight human epithelial barrier and infection of subepithelial dendritic cells. *Blood*, 120(3), 572–580.

- McGill, N. K., Vyas, J., Shimauchi, T., Tokura, Y., & Piguet, V. (2012). HTLV-1-associated infective dermatitis: updates on the pathogenesis. *Experimental dermatology*, 21(11), 815–821.
- Medzhitov R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819–826.
- Mesin, L., Ersching, J., & Victora, G. D. (2016). Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity*, 45(3), 471–482.
- Miller L. S. (2008). Toll-like receptors in skin. *Advances in dermatology*, 24, 71–87.
- Morbach, H., Eichhorn, E. M., Liese, J. G., & Girschick, H. J. (2010). Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clinical and experimental immunology*, 162(2), 271–279.
- Mortaz, E., Alipoor, S. D., Adcock, I. M., Mumby, S., & Koenderman, L. (2018). Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Frontiers in immunology*, 9, 2171.
- Murphy, E. L., Wang, B., Sacher, R. A., Fridey, J., Smith, J. W., Nass, C. C., Newman, B., Ownby, H. E., Garratty, G., Hutching, S. T., & Schreiber, G. B. (2004). Respiratory and urinary tract infections, arthritis, and asthma associated with HTLV-I and HTLV-II infection. *Emerging infectious diseases*, 10(1), 109–116.
- Nagai, M., Tsujii, T., Iwaki, H., Nishikawa, N., & Nomoto, M. (2013). Cerebrospinal fluid neopterin, but not osteopontin, is a valuable biomarker for the treatment response in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*, 52(19), 2203–2208.
- Nagai, M., Usuku, K., Matsumoto, W., Kodama, D., Takenouchi, N., Moritoyo, T., Hashiguchi, S., Ichinose, M., Bangham, C. R., Izumo, S., & 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(6), 586–593.
- Nagai, M., Yamano, Y., Brennan, M. B., Mora, C. A., & Jacobson, S. (2001). Increased HTLV-I proviral load and preferential expansion of HTLV-I Tax-specific CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from patients with HAM/TSP. *Annals of neurology*, 50(6), 807–812.
- Nakagawa, M., Izumo, S., Ijichi, S., Kubota, H., Arimura, K., Kawabata, M., & Osame, M. (1995). HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *Journal of neurovirology*, 1(1), 50–61.
- Narikawa, K., Fujihara, K., Misu, T., Feng, J., Fujimori, J., Nakashima, I., Miyazawa, I., Saito, H., Sato, S., & Itoyama, Y. (2005). CSF-chemokines in HTLV-I-associated myelopathy: CXCL10 up-regulation and therapeutic effect of interferon-alpha. *Journal of neuroimmunology*, 159(1-2), 177–182.
- Nejmeddine, M., Negi, V. S., Mukherjee, S., Tanaka, Y., Orth, K., Taylor, G. P., & Bangham, C. R. (2009). HTLV-1-Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. *Blood*, 114(5), 1016–1025.
- Neviton M Castro, Waldyr Rodrigues, Jr, Daniel M Freitas, Andre Muniz, Paulo Oliveira, Ubirajara Barroso, Juarez Andrade, Edgar M Carvalho. (2005) "ABSTRACT 76: Urinary

- Tract Infection in HTLV-1 Positive Individuals". *The Journal of Urology*, v. 173, n. 4S, p. 21–21.
- Newton, R. C., Limpuangthip, P., Greenberg, S., Gam, A., & Neva, F. A. (1992). *Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a carrier of HTLV-I virus with evidence of selective immunosuppression. *The American journal of medicine*, 92(2), 202–208.
- Okajima, R., Oliveira, A. C., Smid, J., Casseb, J., & Sanches, J. A., Jr (2013). High prevalence of skin disorders among HTLV-1 infected individuals independent of clinical status. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(11), e2546.
- Olindo, S., Cabre, P., Lézin, A., Merle, H., Saint-Vil, M., Signate, A., et al. (2006). Natural history of human T-lymphotropic virus 1–associated myelopathy. *Archives of Neurology* 63, 1560.
- Orland, J. R., Engstrom, J., Fridey, J., Sacher, R. A., Smith, J. W., Nass, C., Garratty, G., Newman, B., Smith, D., Wang, B., Loughlin, K., Murphy, E. L., & HTLV Outcomes Study (2003). Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. *Neurology*, 61(11), 1588–1594.
- Osame, M., Janssen, R., Kubota, H., Nishitani, H., Igata, A., Nagataki, S., Mori, M., Goto, I., Shimabukuro, H., & Khabbaz, R. (1990). Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. *Annals of neurology*, 28(1), 50–56.
- 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.
- Paiva, A. M., Assone, T., Haziot, M. E. J., Smid, J., Fonseca, L. A. M., Luiz, O. D. C., de Oliveira, A. C. P., & Casseb, J. (2018). Risk factors associated with HTLV-1 vertical transmission in Brazil: longer breastfeeding, higher maternal proviral load and previous HTLV-1-infected offspring. *Scientific reports*, 8(1), 7742.
- Parlet, C. P., Brown, M. M., & Horswill, A. R. (2019). Commensal Staphylococci Influence *Staphylococcus aureus* Skin Colonization and Disease. *Trends in microbiology*, 27(6), 497–507.
- Philip, S., Zahoor, M. A., Zhi, H., Ho, Y. K., & Giam, C. Z. (2014). Regulation of human T-lymphotropic virus type I latency and reactivation by HBZ and Rex. *PLoS pathogens*, 10(4), e1004040.
- Pique, C., & Jones, K. S. (2012). Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Frontiers in microbiology*, 3, 378.
- Porto, A. F., Santos, S. B., Alcantara, L., Guerreiro, J. B., Passos, J., Gonzalez, T., Neva, F., Gonzalez, D., Ho, J. L., & Carvalho, E. M. (2004). HTLV-1 modifies the clinical and immunological response to schistosomiasis. *Clinical and experimental immunology*, 137(2), 424–429.
- Powell, D., Lou, M., Barros Becker, F., & Huttenlocher, A. (2018). Cxcr1 mediates recruitment of neutrophils and supports proliferation of tumor-initiating astrocytes in vivo. *Scientific reports*, 8(1), 13285.

- Quispe, N. C., Feria, E. B., Santos-Fortuna, E.deL., & Caterino-de-Araujo, A. (2009). Confirming the presence of HTLV-1 infection and the absence of HTLV-2 in blood donors from Arequipa, Peru. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 51(1), 25–29.
- Raeispour, M., & Ranjbar, R. (2018). Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Antimicrobial resistance and infection control*, 7, 118. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0411-4>
- Reuter, A., Virolle, C., Goldlust, K., Berne-Dedieu, A., Nolivos, S., & Lesterlin, C. (2020). Direct visualisation of drug-efflux in live *Escherichia coli* cells. *FEMS microbiology reviews*, 44(6), 782–792.
- Richardson, J. H., Edwards, A. J., Cruickshank, J. K., Rudge, P., & Dalgleish, A. G. (1990). In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *Journal of virology*, 64(11), 5682–5687.
- Rip, J., de Bruijn, M. J. W., Kaptein, A., Hendriks, R. W., & Corneth, O. B. J. (2020). Phosphoflow Protocol for Signaling Studies in Human and Murine B Cell Subpopulations. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 204(10), 2852–2863.
- Robinson, R. D., Lindo, J. F., Neva, F. A., Gam, A. A., Vogel, P., Terry, S. I., & Cooper, E. S. (1994). Immunoepidemiologic studies of *Strongyloides stercoralis* and human T lymphotropic virus type I infections in Jamaica. *The Journal of infectious diseases*, 169(3), 692–696.
- Rocamonde, B., Carcone, A., Mahieux, R., & Dutartre, H. (2019). HTLV-1 infection of myeloid cells: from transmission to immune alterations. *Retrovirology*, 16(1), 45.
- Romanelli, L. C., Caramelli, P., Martins, M. L., Gonçalves, D. U., Proietti, F. A., Ribas, J. G., Araújo, M. G., & Carneiro-Proietti, A. B. (2013). Incidence of human T cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in a long-term prospective cohort study of initially asymptomatic individuals in Brazil. *AIDS research and human retroviruses*, 29(9), 1199–1202.
- Rosadas, C., & Taylor, G. P. (2022). HTLV-1 and Co-infections. *Frontiers in medicine*, 9, 812016.
- Saito, M., Nakagawa, M., Kaseda, S., Matsuzaki, T., Jonosono, M., Eiraku, N., et al. (2004). Decreased human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and alteration in T cell phenotype after interferon-alpha therapy for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *The Journal of Infectious Diseases* 189, 29–40.
- Salameh, A., Mohajer, M. A., & Daroucihe, R. O. (2015). Prevention of urinary tract infections in patients with spinal cord injury. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 187(11), 807–811.
- Sattler S. (2017). The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection. *Advances in experimental medicine and biology*, 1003, 3–14.
- Schierhout, G., McGregor, S., Gessain, A., Einsiedel, L., Martinello, M., & Kaldor, J. (2020). Association between HTLV-1 infection and adverse health outcomes: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *The Lancet. Infectious diseases*, 20(1), 133–143.

- Schuldiner S. (2018). The Escherichia coli effluxome. *Research in microbiology*, 169(7-8), 357–362.
- Seiki, M., Hattori, S., Hirayama, Y., & Yoshida, M. (1983). Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(12), 3618–3622.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), a000414.
- Sivick, K. E., & Mobley, H. L. (2010). Waging war against uropathogenic Escherichia coli: winning back the urinary tract. *Infection and immunity*, 78(2), 568–585.
- Sizar O, Leslie SW, Unakal CG. Gram-Positive Bacteria. (2023). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Nih.gov. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470553/>.
- Snyder, A. Hypergammaglobulinemia. (2018). Healthline. Disponível em: <https://www.healthline.com/health/hypergammaglobulinemia>.
- Souza, F. D. S., Freitas, N. L., Gomes, Y. C. P., Torres, R. C., Echevarria-Lima, J., da Silva-Filho, I. L., Leite, A. C. C. B., de Lima, M. A. S. D., da Silva, M. T. T., Araújo, A. Q. C., & Espíndola, O. M. (2021). Following the Clues: Usefulness of Biomarkers of Neuroinflammation and Neurodegeneration in the Investigation of HTLV-1-Associated Myelopathy Progression. *Frontiers in immunology*, 12, 737941.
- Starling, S., & Jolly, C. (2016). LFA-1 Engagement Triggers T Cell Polarization at the HIV-1 Virological Synapse. *Journal of virology*, 90(21), 9841–9854.
- Steigbigel, R. T., Lambert, L. H., Jr, & Remington, J. S. (1974). Phagocytic and bacterial properties of normal human monocytes. *The Journal of clinical investigation*, 53(1), 131–142.
- Stillie, R., Farooq, S. M., Gordon, J. R., & Stadnyk, A. W. (2009). The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN. *Journal of leukocyte biology*, 86(3), 529–543.
- Tamaki, K., Sato, T., Tsugawa, J., Fujioka, S., Yagishita, N., Araya, N., et al. (2019). Cerebrospinal fluid CXCL10 as a candidate surrogate marker for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Frontiers in Microbiology* 10, 2110.
- Thau, L., Asuka, E., & Mahajan, K. (2023). Physiology, Opsonization. In StatPearls. StatPearls Publishing. Nih.gov Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30480954/>.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International journal of cancer*, 26(2), 171–176.
- Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K., & Uchino, H. (1977). Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*, 50(3), 481–492.
- Umehara, F., Izumo, S., Nakagawa, M., Ronquillo, A. T., Takahashi, K., Matsumuro, K., Sato, E., & Osame, M. (1993). Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 52(4), 424–430.

- Umehara, F., Izumo, S., Takeya, M., Takahashi, K., Sato, E., & Osame, M. (1996). Expression of adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1) in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *Acta neuropathologica*, 91(4), 343–350.
- Van Prooyen, N., Gold, H., Andresen, V., Schwartz, O., Jones, K., Ruscetti, F., Lockett, S., Gudla, P., Venzon, D., & Franchini, G. (2010). Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(48), 20738–20743.
- Vasquez, P., Sanchez, G., Volante, C., Vera, L., Ramirez, E., Soto, G., & Lee, H. (1991). Human T-lymphotropic virus type I: new risk for Chilean population. *Blood*, 78(3), 850–851.
- Viana, A. S. (2019). Painel Multicêntrico da Epidemiologia Molecular de 600 Amostras De *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina Coletadas em Hospitais Localizados no Rio de Janeiro [Dissertação de Mestrado]. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Volpe, G. J., Vessoni, S. C. S., Soares, L. B., Leite Dos Santos Almeida, M. A. A., Braga, P. E., de Moraes, G. R., Ferreira, N. N., Garibaldi, P. M. M., Kashima, S., Fonseca, B. A. L., Calado, R. T., García, H. A. B., de França, J. I. D., de Lima, M. A., Pacheco, P. H. M., Borges, M. C., & Covas, D. T. (2023). Antibody response dynamics to CoronaVac vaccine and booster immunization in adults and the elderly: A long-term, longitudinal prospective study. *IJID regions*, 7, 222–229.
- Walter, M. J., Lehky, T. J., Fox, C. H., & Jacobson, S. (1994). In situ PCR for the detection of HTLV-I in HAM/TSP patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 724, 404–413.
- Wik, J. A., & Skålhegg, B. S. (2022). T Cell Metabolism in Infection. *Frontiers in immunology*, 13, 840610.
- Williams, C. K., Alexander, S. S., Bodner, A., Levine, A., Saxinger, C., Gallo, R. C., & Blattner, W. A. (1993). Frequency of adult T-cell leukaemia/lymphoma and HTLV-I in Ibadan, Nigeria. *British journal of cancer*, 67(4), 783–786.
- Williams, C. K., Dada, A., & Blattner, W. A. (1994). Some epidemiological features of the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and ATL in Nigerians. *Leukemia*, 8 Suppl 1, S77–S82.
- Wong, P., & Pamer, E. G. (2003). CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annual review of immunology*, 21, 29–70.
- Yamano, Y., & Coler-Reilly, A. (2017). HTLV-1 induces a Th1-like state in CD4+CCR4+ T cells that produces an inflammatory positive feedback loop via astrocytes in HAM/TSP. *Journal of neuroimmunology*, 304, 51–55.
- Yamauchi, J., Araya, N., Yagishita, N., Sato, T., & Yamano, Y. (2021). An update on human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) focusing on clinical and laboratory biomarkers. *Pharmacology & therapeutics*, 218, 107669.
- Yasunaga, Ji., Matsuoka, M. (2014). Human T-Cell Leukemia Virus Type 1: Pathogenesis and Host Immune Response. Springer, p. 229–262.

Young, C., & Brink, R. (2021). The unique biology of germinal center B cells. *Immunity*, 54(8), 1652–1664.

Zhao, T., & Matsuoka, M. (2012). HBZ and its roles in HTLV-1 oncogenesis. *Frontiers in microbiology*, 3, 247.

Ziegler-Heitbrock, L., & Hofer, T. P. (2013). Toward a refined definition of monocyte subsets. *Frontiers in immunology*, 4, 23.

## ANEXO

**Supplementary Table 1. IPEC-2 disability scale.**


---

<b>Motor score: Gait</b>
0. Normal
1. Abnormal but can walk independently
2. Abnormal and dependent on eventual unilateral support
3. Abnormal and dependent on permanent unilateral support
4. Abnormal and dependent on eventual bilateral support
5. Abnormal and dependent on permanent bilateral support
6. Abnormal, dependent on permanent bilateral support, and occasional use of a wheelchair (WC)
7. Permanent use of a WC, stands up and remains upright without support
8. Permanent use of a WC, uses arms to stand up and remains upright without support
9. Permanent use of a WC, needs assistance from others to stand up and remain upright with support
10. Permanent use of a WC, unable to stand up, exhibits voluntary movements of the lower limbs when seated
11. Permanent use of WC, unable to stand up, and does not have any voluntary movements of the lower limbs
<b>Motor score: Running</b>
0. Runs
1. Unable to run
<b>Motor score: Climbing stairs</b>
0. Climbs
1. Climbs only when holding the handrail
2. Unable to climb
<b>Motor score: Jumping</b>
0. Jumps on one or two feet
1. Jumps on two feet, but not with only one
2. Jumps on two feet only with hand support
3. Unable to jump
<b>Spasticity score: Clonus</b>
0. Absent
1. Only induced by the examiner
2. Spontaneous
<b>Spasticity score: Flexor/extensor spasms</b>
0. Absent
1. Present
<b>Sensory score: Paresthesia</b>
0. Absent
1. Present, eventually
2. Present, permanently
<b>Sensory score: Lumbar pain</b>
0. Absent
1. Present, eventually
2. Present during most of the day
<b>Sensory score: Lower limb pain</b>
0. Absent
1. Present, eventually
2. Present during most of the day
<b>Sphincter score: Bladder control</b>
0. Total
1. Urgency
2. Eventual incontinence or retention
3. Use of permanent catheter or regular use of relieving catheter
<b>Sphincter score: Bowel continence</b>
0. Normal
1. Constipation
2. Incontinence or total retention, needs manual extraction or enemas
<b>Total: 0–31</b>

---

From Souza et al., *Frontiers in Immunology* 2021;12:737941 (doi: 10.3389/fimmu.2021.737941)