



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO BIOMEDICINA

MURILLO LOPES LIMA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T
REGULATÓRIOS PRODUTORES DE IL-10 EM PACIENTES
INFECTADOS COM HTLV-1**

SALVADOR – BA
2023

MURILLO LOPES LIMA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS
PRODUTORES DE IL-10 EM PACIENTES INFECTADOS COM HTLV-1**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dra. Luana Leandro Gois

SALVADOR – BA

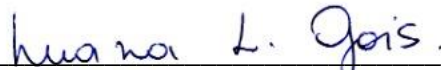
2023

MURILLO LOPES LIMA DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS
PRODUTORES DE IL-10 EM PACIENTES INFECTADOS COM HTLV-1**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovada em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

Salvador – BA, 10 de novembro de 2023.




Profa. Dra. Luana Leandro Gois

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Prof. Dr. Filipe Ferreira de Almeida Rego

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



Prof. Dr. Raimundo Coutinho

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Silvia e Valnei, pelo amor, carinho e dedicação ao meu desenvolvimento, além de todo o investimento na minha educação.

A minha família, por cada palavra de motivação e confiança.

Aos meus amigos, por prestarem apoio nos momentos difíceis da minha jornada.

A minha companheira, Isadora, por me incentivar a melhorar, me auxiliar em todo o meu trajeto e por todo o carinho.

A minha orientadora, Profa. Dra. Luana Leandro Gois, por cada ensinamento e conhecimento passado que me auxiliou na minha formação.

RESUMO

O vírus linfotrófico de células T humano do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus causador da Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), uma patologia caracterizada por um distúrbio inflamatório crônico no sistema nervoso central. Trata-se de um estudo de corte transversal analítico, onde foram incluídos onze pacientes infectados com HTLV-1 com o diagnóstico para HAM/TSP e assintomáticos para a doença. O objetivo do estudo foi avaliar a frequência e função das células T regulatórias (Treg) em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP, pois a literatura demonstra que o perfil inflamatório da doença pode estar relacionado com a atividade de FOXP3 e consequentemente das células Treg. Foram incluídos pacientes maiores de dezoito anos, e foram excluídos indivíduos com presença de coinfeções virais crônicas e uso de corticosteroides. Foi feita uma coleta de dados clínicos e de amostra de sangue para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), além da obtenção da carga proviral a partir do DNA. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo com marcação por anticorpos monoclonais. Foi identificada uma correlação significativa entre a carga proviral e a frequência de linfócitos Treg produtores de Interleucina-10 (IL-10), porém os outros resultados de análise de frequência de células entre os grupos assintomático e HAM/TSP não demonstraram diferenças significantes. A partir da obtenção dos resultados é possível relacionar o mecanismo patogênico do vírus com o sistema imunológico, de forma que o HTLV-1 suprime a ativação de células Treg, favorecendo o aumento do perfil inflamatório nos pacientes acometidos pela HAM/TSP.

Palavras-chave: FOXP3, HAM/TSP, Treg.

RESUMO EM LÍNGUA ESTRANGEIRA
(ABSTRACT - inglês)
RESUMEN – Espanhol
RESUME – Francês

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a retrovirus that causes HTLV-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP), a pathology characterized by a chronic inflammatory disorder in the central nervous system. This is an analytical cross-sectional study that included eleven patients infected with HTLV-1, diagnosed with Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-Associated Myelopathy (HAM/TSP), and asymptomatic for the disease. The study aimed to evaluate the frequency and function of regulatory T cells (Treg) in individuals infected with HTLV-1 with HAM/TSP, as the literature suggests that the inflammatory profile of the disease may be related to the activity of FOXP3 and consequently Treg cells. Patients over eighteen years old were included, and individuals with chronic viral co-infections (HIV, Hepatitis B and C) and those using corticosteroids were excluded. Clinical data and blood samples were collected to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMC), as well as to determine the proviral load from DNA. The samples were analyzed by flow cytometry with monoclonal antibody labeling. A significant correlation was found between the proviral load and the frequency of Interleukin-10 (IL-10)-producing Treg lymphocytes. However, the other results of cell frequency analysis between the asymptomatic and HAM/TSP groups did not show significant differences. These results suggest a connection between the virus's pathogenic mechanism and the immune system, where HTLV-1 suppresses the activation of Treg cells, favoring the increase in the inflammatory profile in patients affected by HAM/TSP.

Keywords: FOXP3, HAM/TSP, Treg

SUMÁRIO

1. Artigo: Avaliação da Frequência de Linfócitos T Regulatórios Produtores de IL-10 em Pacientes Infectados com HTLV-1.....08
2. Propost.....22

Artigo Científico**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS
PRODUTORES DE IL-10 EM PACIENTES INFECTADOS COM HTLV-1****LINFÓCITOS TREG NA HAM/TSP**

Murillo Lopes Lima De Sousa¹, Luana Leandro Gois¹

¹ Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brasil

***Autor correspondente:** Luana Leandro Gois, biomédica, mestre e doutora em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Faculdade de Medicina, Rua Silveira Martins, Cabula, Salvador, Bahia, Brasil. Telefone para contato: 71 98892-9007. E-mail para contato: luanagois@bahiana.edu.br

RESUMO

O vírus linfotrópico de células T humano do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus causador da Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), uma patologia caracterizada por um distúrbio inflamatório crônico no sistema nervoso central. Trata-se de um estudo de corte transversal analítico, onde foram incluídos onze pacientes infectados com HTLV-1 com o diagnóstico para HAM/TSP e assintomáticos para a doença. O objetivo do estudo foi avaliar a frequência e função das células T regulatórias (Treg) em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP, pois a literatura demonstra que o perfil inflamatório da doença pode estar relacionado com a atividade de FOXP3 e consequentemente das células Treg. Foram incluídos pacientes maiores de dezoito anos, e foram excluídos indivíduos com presença de coinfeções virais crônicas e uso de corticosteroides. Foi feita uma coleta de dados clínicos e de amostra de sangue para obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), além da obtenção da carga proviral a partir do DNA. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo com marcação por anticorpos monoclonais. Foi identificada uma correlação significativa entre a carga proviral e a frequência de linfócitos Treg produtores de Interleucina-10 (IL-10), porém os outros resultados de análise de frequência de células entre os grupos assintomático e HAM/TSP não demonstraram diferenças significantes. A partir da obtenção dos resultados é possível relacionar o mecanismo patogênico do vírus com o sistema imunológico, de forma que o HTLV-1 suprime a ativação de células Treg, favorecendo o aumento do perfil inflamatório nos pacientes acometidos pela HAM/TSP.

Palavras-chave: FOXP3, HAM/TSP, Treg.

ABSTRACT

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a retrovirus that causes HTLV-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP), a pathology characterized by a chronic inflammatory disorder in the central nervous system. This is an analytical cross-sectional study that included eleven patients infected with HTLV-1, diagnosed with Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-Associated Myelopathy (HAM/TSP), and asymptomatic for the disease. The study aimed to evaluate the frequency and function of regulatory T cells (Treg) in individuals infected with HTLV-1 with HAM/TSP, as the literature suggests that the inflammatory profile of the disease may be related to the activity of FOXP3 and consequently Treg cells. Patients over eighteen years old were included, and individuals with chronic viral co-infections (HIV, Hepatitis B and C) and those using corticosteroids were excluded. Clinical data and blood samples were collected to obtain peripheral blood mononuclear cells (PBMC), as well as to determine the proviral load from DNA. The samples were analyzed by flow cytometry with monoclonal antibody labeling. A significant correlation was found between the proviral load and the frequency of Interleukin-10 (IL-10)-producing Treg lymphocytes. However, the other results of cell frequency analysis between the asymptomatic and HAM/TSP groups did not show significant differences. These results suggest a connection between the virus's pathogenic mechanism and the immune system, where HTLV-1 suppresses the activation of Treg cells, favoring the increase in the inflammatory profile in patients affected by HAM/TSP.

Keywords: FOXP3, HAM/TSP, Treg.

1. INTRODUÇÃO

Desde a sua descoberta como o primeiro retrovírus oncogênico humano, o HTLV-1 (Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do tipo 1) demonstrou um grande potencial de disseminação, e atualmente o vírus prevalece no mundo todo. A infecção do HTLV-1 é persistente e existem cerca de 5-10 milhões de casos de infecção no mundo.⁽¹⁻²⁾ Suas vias de transmissão são amplas, podendo ser transmitido sexualmente, por contato sanguíneo e pela forma vertical (mãe para filho), através da via transplacentária ou da amamentação.⁽³⁾ A disseminação do HTLV-1 ocorre em todo globo, apresentando-se como endemia em diversas regiões, concentrando-se principalmente no Japão, Melanésia, algumas partes da África e América do Sul.⁽⁴⁾ O HTLV-1 possui regiões do seu genoma que compartilham as mesmas configurações de outros vírus da família Retroviridae (gag, pol, pro e env) porém a parte 3' (região px) do seu genoma comporta muitos genes acessórios como: tax, rex, p12, p2, p13, p30 e HBZ.⁽⁵⁾

O HTLV-1 está relacionado a duas principais patologias: o Linfoma de Células T do Adulto (ATL) e a Mielopatia Associada ao HTLV ou Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP). A HAM/TSP é uma mielopatia que apresenta uma evolução crônica e progressiva, caracterizada por uma paraparesia (perda parcial de funções motoras).⁽⁶⁾ A mielopatia se apresenta em apenas 1 - 4% da população infectada, porém a maioria dos indivíduos infectados não desenvolvem doença e tornam-se portadores assintomáticos ao longo da vida.⁽⁷⁾ Indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 tendem a apresentar uma carga proviral mais baixa e uma eficiência maior de células T CD8+ citotóxica quando são comparados a indivíduos com HAM/TSP.⁽⁵⁾ Portadores assintomáticos podem apresentar sintomas inespecíficos que se manifestam geralmente após os 40 anos, sendo os sintomas neurológicos os mais comuns, como dores nos membros inferiores e na lombar, além da dificuldade de micção ou defecação.⁽⁸⁾

A literatura demonstra que a partir do primeiro contato com o organismo humano, o HTLV-1 regula sua infecção através de suas proteínas virais HBZ e TAX que possuem uma participação muito importante na patogênese das doenças causadas pelo vírus e estão relacionadas fortemente com a proliferação celular e sobrevivência das células infectadas.⁽⁹⁾ O papel de HBZ está ligado à promoção do crescimento e a proliferação celular.⁽¹⁰⁾ As quantidades de transcritos de HBZ se correlacionam com a carga proviral em pacientes portadores assintomáticos e HAM/TSP. Já a função de TAX está correlacionada a transcrição proviral e ao desenvolvimento de células neoplásicas exercendo efeitos pleiotrópicos na sinalização celular, e diferente de HBZ, TAX é expressa apenas no início da transformação leucêmica, pois

posteriormente a sua expressão é perdida nas células ATL.⁽¹¹⁾ Na HAM/TSP, TAX e HBZ são diretamente proporcionais a carga proviral, evidenciando seus envolvimento na patologia. HBZ demonstra um papel pró-inflamatório crucial, alterando a regulação do sistema imune, enquanto TAX aumenta a replicação do vírus e sua proliferação.⁽¹²⁾

A resposta imune está associada à patogênese da HAM/TSP. O estado de inflamação crônica também é causado pelos efeitos da infecção viral com aumento da ativação de células e produção de citocinas e quimiocinas.⁽¹¹⁾ Nos indivíduos saudáveis, a célula T regulatória (Treg) se faz muito presente no sistema imune, regulando-o através de sua atividade imunossupressora. As células Treg são identificadas pela expressão intracelular do regulador transcricional Foxp3, que possui um papel fundamental no funcionamento das células Treg, mediando o controle do sistema imunológico utilizando citocinas imunossupressoras, como a Interleucina-10 (IL-10). Na infecção do HTLV-1, as células Treg (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) são consideradas também como reservatório viral, e foram observadas reduções significativas da expressão de Foxp3 e conseqüentemente também a redução da função das Treg. Indivíduos HAM/TSP apresentam uma redução da frequência de células T regulatórias e aumento de células pró-inflamatórias, caracterizando seu mecanismo patogênico inflamatório.⁽⁹⁻¹³⁻¹⁴⁾

O vírus HTLV-1 apresenta uma patogênese muito evasiva e crônica. O caráter inflamatório gerado pelo vírus na HAM/TSP influenciado pelas proteínas virais TAX e HBZ tem forte relação com as células Treg, já que essas proteínas são fundamentais no desenvolvimento das patologias e na sobrevivência viral. Estudos observam a intervenção de Tax e HBZ nas células regulatórias, mais especificamente na molécula Foxp3, onde o HBZ induz a sua expressão, mas ele possui a capacidade de se ligar e impedir a sua ligação com o DNA, interferindo na diferenciação para o perfil regulatório.⁽¹⁵⁾ Ainda que haja muitos estudos a respeito das interações do HTLV-1, seus mecanismos não são totalmente elucidados e se faz necessário mais pesquisas para compreender o seu funcionamento e investigar o comprometimento da imunorregulação que contribui para o perfil inflamatório observado na HAM/TSP. O objetivo do estudo foi avaliar a frequência e função das células T regulatórias em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP.

2. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo de corte transversal analítico. Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico confirmado de infecção por HTLV-1. Um total de 11 pacientes foram avaliados, sendo 5 pacientes com confirmação diagnóstica de HAM/TSP e 6 indivíduos assintomáticos para HAM/TSP. Todos os pacientes incluídos no estudo foram provenientes do

Centro Integrativo e Multidisciplinar de Atendimento ao Portador de HTLV (CHTLV) da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP) e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Os critérios de inclusão utilizados foram: indivíduos maiores de 18 anos infectados pelo HTLV-1, acompanhados no CHTLV com diagnóstico de HAM/TSP ou assintomático definido pelo neurologista. Os critérios de exclusão foram a presença de coinfeções virais crônicas (HIV, Hepatites B e C) e uso de corticosteroides. As informações sobre características clínicas e epidemiológicas dos pacientes foram obtidas através da análise dos prontuários. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da EBMSP sob número de protocolo CAAE: 19290919.5.0000.5544, Número do Parecer: 3.787.642.

Uma amostra de 20 mL de sangue em tubos de EDTA e heparina foi coletada no momento da inclusão no estudo. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram separadas a partir do sangue total. A carga proviral do HTLV-1 foi quantificada usando o método de reação em cadeia da polimerase em tempo real TaqMan (PCR), conforme descrito anteriormente [36]. Em resumo, os iniciadores SK110/SK111 foram utilizados para amplificar um fragmento de 186 pb do gene pol, com uma sonda TaqMan dupla (5'-FAM/5' VIC e 3'-TAMRA) localizada entre 4829 e 4858 pb da sequência de referência do HTLV-1 (HTLVATK). O DNA de albumina foi utilizado como referência endógena. O limite de detecção foi estabelecido pela curva padrão, correspondendo a 101 cópias. A partir do DNA foi detectada a carga proviral. Os valores da carga proviral do HTLV-1 foram calculados da seguinte forma: [(número médio de cópias do HTLV-1)/(número médio de cópias de albumina)] $\times 2 \times 10^6$, expressos como o número de cópias do HTLV-1 por 10^6 células.⁽¹⁶⁾ Os linfócitos T regulatórios foram quantificados por citometria de fluxo. Para tal, as PBMC foram cultivadas em meio RPMI completo suplementado com Soro Fetal Bovino por 24h na presença de fitohemaglutinina ou apenas meio à 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD25, anti-FOXP3 e anti-IL-10). Foram utilizados os bloqueadores de vesículas transportadoras Brefaldina A e Monensina na cultura para permitir a marcação intracelular das citocinas. E utilizamos os reagentes *fixation buffer* para manter as células estáveis com a marcação e *permeabilization buffer* para permeabilizar a membrana das células fazendo poros em sua superfície, permitindo a penetração do anticorpo monoclonal e a marcação intracelular (ThermoFisher Scientific). As PBMC foram adquiridas no FACS Fortessa (BD biosciences) e os dados gerados na citometria foram analisados no software FlowJo.

Os dados foram tabulados em planilhas Excel e analisados no GraphPad Prisma (versão

9.0). As variáveis quantitativas, como a idade, frequência de células e a carga proviral, foram apresentadas em mediana e mínima e máxima. As variáveis qualitativas, como sexo e cor de pele, foram apresentadas em distribuição de frequência. As variáveis quantitativas foram comparadas entre os grupos através do teste Mann-Whitney. As variáveis qualitativas foram comparadas entre os grupos aplicando o teste exato de Fisher. Estes dados também foram correlacionados utilizando o teste de Correlação de Spearman. As diferenças estatísticas foram consideradas significantes com o p-valor sendo < 0.05 .

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização dos pacientes

O estudo analisou um total de 11 pacientes infectados pelo HTLV-1, sendo que cinco deles possuem o diagnóstico de HAM/TSP e seis são assintomáticos. No grupo de assintomáticos foram incluídos dois indivíduos do sexo masculino e quatro indivíduos do sexo feminino, sendo três pacientes da cor preta e três pardas que juntos apresentaram uma mediana de idade de 55,5 anos, e uma mediana de carga proviral de $12,69 \times 10^6$ cópias/ 10^6 células ($7,13 \times 10^6$ - $128,31 \times 10^6$). O grupo HAM/TSP incluiu quatro indivíduos do sexo feminino e um do sexo masculino, sendo três pacientes da cor parda e dois pacientes da cor preta, apresentando uma mediana de idade de 55 anos e uma mediana de carga proviral de $25,35 \times 10^6$ cópias/ 10^6 células ($10,24 \times 10^6$ - $85,03 \times 10^6$). Todas as variáveis presentes na caracterização dos pacientes não apresentaram $p > 0,05$ (Tabela).

3.2. Frequência de linfócitos

As populações de linfócitos foram comparadas entre o grupo HAM/TSP e o grupo assintomático. A frequência de linfócitos T CD4+ e linfócitos T regulatórios foram semelhantes entre os grupos (Figura 1).

Em relação aos linfócitos T regulatórios produtores de IL-10 foi possível observar uma maior frequência de no grupo de pacientes assintomáticos (17,15%, 0,00% – 42,90%) quando comparado ao grupo de pacientes HAM/TSP (9,26%, 0,00% – 19,40%), embora não tenha apresentado diferença estatística ($p=0,32$) (Figura 2).

3.3. Correlação entre os linfócitos T regulatórios (CD25+FOXP3+) e a carga proviral

Não foi identificada nenhuma correlação entre a frequência de linfócitos T regulatórios e a carga proviral nos grupos assintomáticos e HAM/TSP. Porém, uma correlação significativa entre a frequência de linfócitos T regulatórios produtores de IL-10 e a carga proviral

foi observada no grupo assintomático ($r=0,94$, $p=0,01$) (Figura 3).

4. DISCUSSÃO

A HAM/TSP é classificada como um distúrbio neuroinflamatório crônico causada pela infecção do HTLV-1 e estudos sugerem que sua patogênese tem relação com a regulação do sistema imune.⁽⁶⁾ As células T regulatórias são linfócitos diferenciados com uma função moderadora do sistema imune, podendo diminuir o recrutamento das células de defesa através da liberação de citocinas imunossupressoras, como a IL-10, que desempenha um papel muito importante de imunossupressão.⁽¹³⁾ A célula Treg é considerada como o principal reservatório do HTLV-1 e sua função pode afetar o desenvolvimento da patogênese da HAM/TSP.⁽¹⁷⁾ Foxp3 é uma proteína e fator de transcrição presente intracelularmente nas células T regulatórias (CD4+CD25+) e defeitos na sua função sugerem relação com efeitos negativos na regulação imunológica.⁽¹³⁾

Estudos já demonstraram que há uma relação entre as células T regulatórias e o HTLV-1, tendo HBZ como um indutor da proliferação de células Treg, porém também induzindo a disfunção de Foxp3.⁽¹³⁾ O desenvolvimento da inflamação através da infecção também pode mostrar associação com o aumento de IL-10 e células Treg disfuncionais, embora também a redução da produção de IL-10 provocada pelos possíveis efeitos do HBZ na célula T regulatória via inibição de FOXP3 também possa se relacionar com a aceleração da inflamação.⁽¹¹⁾

A maioria das análises das variáveis não revelam diferenças entre os pacientes assintomáticos e HAM/TSP, porém é importante salientar que a infecção por HTLV-1 provoca uma ampla variedade de distúrbios na imunidade, podendo interferir na avaliação mais precisa da função regulatória. A menor frequência de linfócitos Treg no grupo de HAM/TSP pode estar associada à disfunção de Foxp3 causada pela infecção do HTLV-1, que conseqüentemente pode levar a diminuição da circulação de células Treg. A maior produção de IL-10 pelos linfócitos Treg e sua correlação com a carga proviral em pacientes assintomáticos pode indicar que nestes indivíduos a função regulatória parece preservada nestes indivíduos. Esta correlação pode estar sendo influenciada devido a maior frequência de células T regulatórias em assintomáticos. A expansão de Treg pode auxiliar no controle da inflamação e do dano tecidual causados pelos linfócitos T citotóxicos (CTL), que são importantes para o controle da carga proviral que se mantém em baixos níveis em indivíduos assintomáticos.

O estudo apresentou limitações envolvendo o número amostral dos participantes,

que será ampliado futuramente e pretendemos incluir a correlação da frequência de células Treg com a expressão de genes do hospedeiro. É interessante reforçar a hipótese de que *hbz* e *tax* interferem na expressão de FOXP3 e na atividade funcional de Treg. Esperamos aumentar o número de pacientes para confirmar os resultados. Além disso pretendemos concluir a análise da expressão gênica para verificar se existe correlação entre a frequência de Treg e a expressão de *hbz* e *tax*.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados preliminares, não houve diferença na frequência de células Treg e células Treg produtoras de citocinas entre os pacientes HAM/TSP e Assintomáticos.

REFERÊNCIAS

1. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci.* dezembro de 1980;77(12):7415–9.
2. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol.* 15 de novembro de 2012;3:388.
3. Manns A, Wilks RJ, Murphy EL, Haynes G, Figueroa JP, Barnett M, et al. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int J Cancer.* 30 de julho de 1992;51(6):886–91.
4. Mueller N. The epidemiology of HTLV-I infection. *Cancer Causes Control.* janeiro de 1991;2(1):37–52.
5. Cook LB, Elemans M, Rowan AG, Asquith B. HTLV-1: persistence and pathogenesis. *Virology.* 5 de janeiro de 2013;435(1):131–40.
6. Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene.* 5 de setembro de 2005;24(39):6058–68.
7. Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y, et al. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1990;3(11):1096–101.
8. Romanelli LCF, Caramelli P, Proietti AB de FC. O vírus linfotrópico de células T humanos tipo 1 (HTLV-1): Quando suspeitar da infecção? *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56:340–7.
9. Yamano Y, Takenouchi N, Li HC, Tomaru U, Yao K, Grant CW, et al. Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. *J Clin Invest.* 2 de maio de 2005;115(5):1361–8.

10. Satou Y, Yasunaga J ichirou, Yoshida M, Matsuoka M. *HTLV-I basic leucine zipper factor* gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci.* 17 de janeiro de 2006;103(3):720–5.
11. Forlani G, Shallak M, Accolla RS, Romanelli MG. HTLV-1 Infection and Pathogenesis: New Insights from Cellular and Animal Models. *Int J Mol Sci.* 27 de julho de 2021;22(15):8001.
12. Enose-Akahata Y, Vellucci A, Jacobson S. Role of HTLV-1 Tax and HBZ in the Pathogenesis of HAM/TSP. *Front Microbiol.* 21 de dezembro de 2017;8:2563.
13. Araya N, Sato T, Yagishita N, Ando H, Utsunomiya A, Jacobson S, et al. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and Regulatory T Cells in HTLV-1-Associated Neuroinflammatory Disease. *Viruses.* 25 de agosto de 2011;3(9):1532–48.
14. Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M, Bluestone JA. Distinct roles of CTLA-4 and TGF- β in CD4 + CD25 + regulatory T cell function. *Eur J Immunol.* novembro de 2004;34(11):2996–3005.
15. Satou Y, Yasunaga J ichirou, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, et al. HTLV-1 bZIP Factor Induces T-Cell Lymphoma and Systemic Inflammation In Vivo. *PLOS Pathogens.* 10 de fevereiro de 2011;7(2):e1001274.
16. Dehee, A.; Cesaire, R.; Desire, N.; Lezin, A.; Bourdonne, O.; Bera, O.; Plumelle, Y.; Smadja, D.; Nicolas, J. C., Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods* 2002, 102, (1-2), 37-51.10.1016/s0166-0934(01)00445-1
17. Yamano Y, Cohen CJ, Takenouchi N, Yao K, Tomaru U, Li HC, et al. Increased Expression of Human T Lymphocyte Virus Type I (HTLV-I) Tax11-19 Peptide–Human Histocompatibility Leukocyte Antigen A*201 Complexes on CD4+ CD25 + T Cells Detected by Peptide-specific, Major Histocompatibility Complex–restricted Antibodies in Patients with HTLV-I–associated Neurologic Disease. *J Exp Med.* 17 de maio de 2004;199(10):1367–77.

Tabela: Caracterização dos pacientes incluídos no estudo.

Idade e carga proviral são apresentados em mediana (mínimo e máximo).

Caracterização	Assintomático	HAM/TSP	P Valor
Sexo (%)			
Feminino	(n=4) 77,77%	(n=4) 80%	0,11
Masculino	(n=2) 33,33 %	(n=1) 20%	
Idade (anos)	55,5 (42-69)	55 (37-64)	0,57
Cor (%)			
Preto	(n=3) 50%	(n=2) 40%	0,20
Pardo	(n=3) 50%	(n=3) 60%	
Branco	(n=0) 0%	(n=4) 0%	
Carga proviral (cópias de DNA viral /10 ⁶)	12.695 x10 ⁶ (7,13x10 ⁶ -128,31x10 ⁶)	25,35x10 ⁶ (10,24x10 ⁶ - 85,03x10 ⁶)	0,26

Figura 1: Gráficos de frequências de linfócitos.

Frequência de Linfócitos e TCD4+

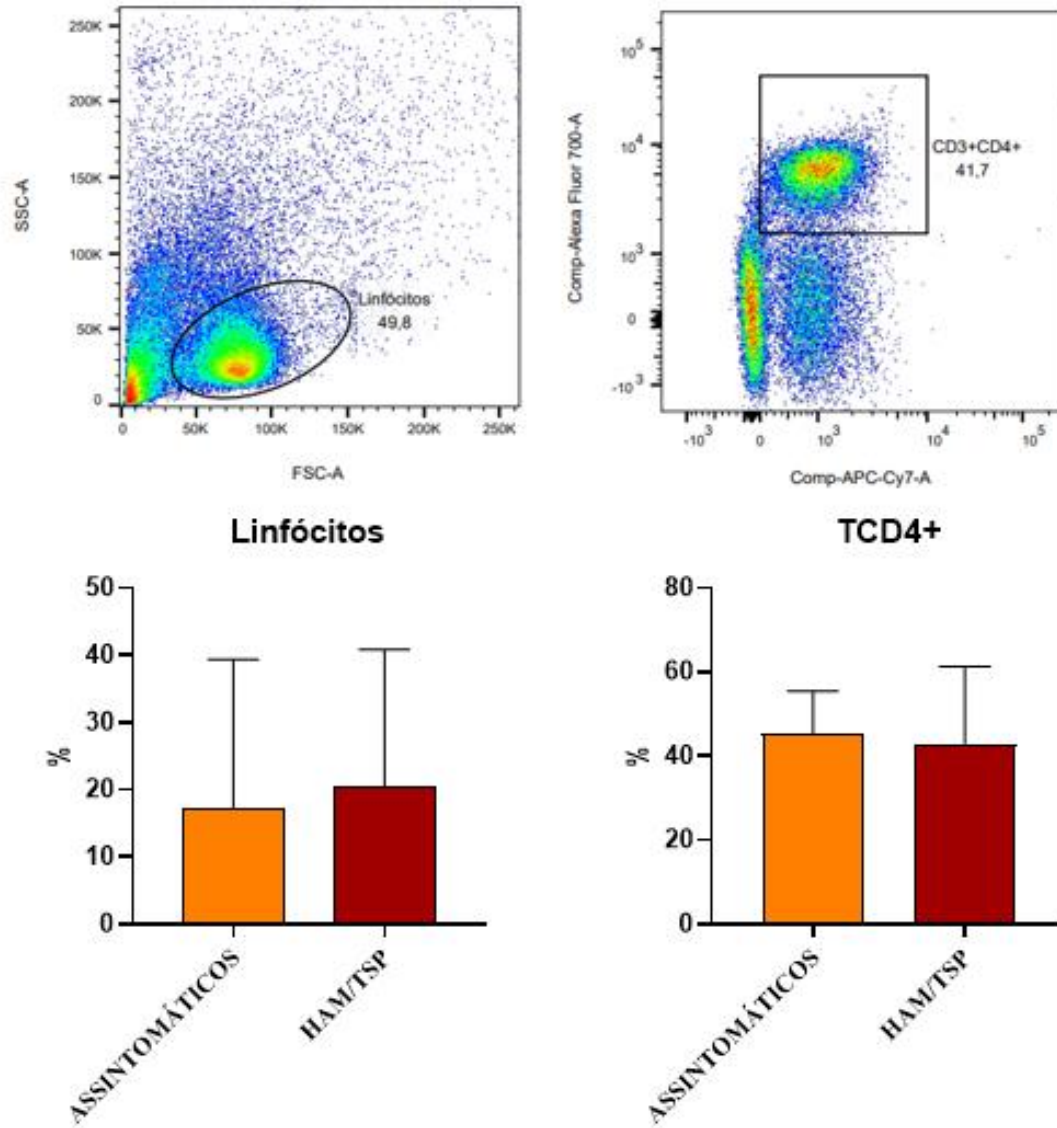


Figura 2: Gráficos de frequências de linfócitos Treg e linfócitos Treg produtores de IL-10.

Frequência de Tregs e IL-10

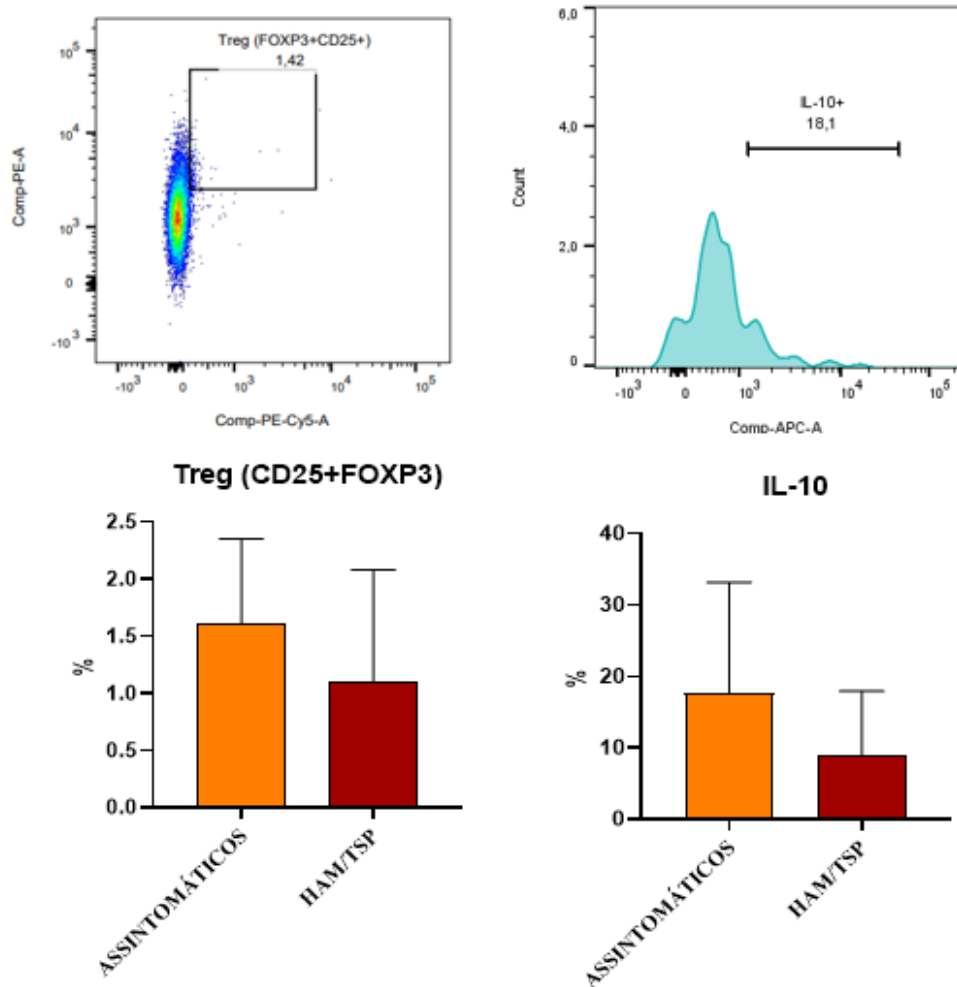
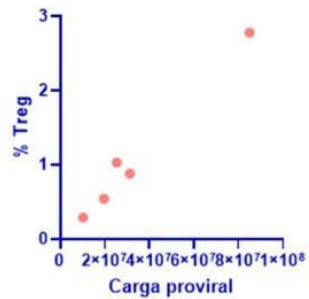


Figura 3: Gráficos de correlação entre as frequências de linfócitos Treg e Treg produtores de IL-10 e a carga proviral dos pacientes assintomáticos e HAM/TSP.

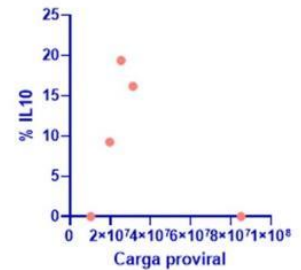
Correlação entre os linfócitos T regulatórios e a carga proviral

Grupo HAM/TSP

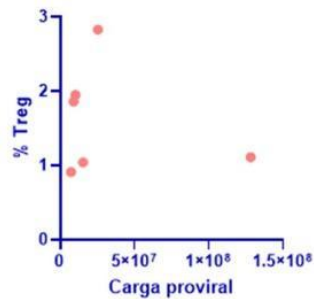


Correlação entre os linfócitos T regulatórios produtores de IL-10 e a carga proviral

Grupo HAM/TSP

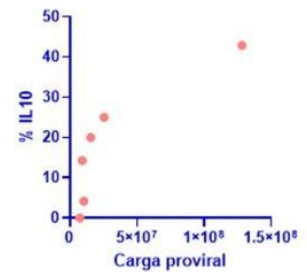


Grupo assintomático



Grupo assintomático

$p = 0,01$



1. Proposta de submissão

1.1 Revista: Revista Brasileira de Neurologia (<https://revistas.ufrj.br/index.php/rbn>)

1.2 Regras para Submissão:

Apresentação (página de rosto):

- a. Título sintético e preciso, com até 150 caracteres; incluir título abreviado até 30 caracteres;
- b. Autor: nome e sobrenome, este como desejado para indexação;
- c. Informações complementares: nome da instituição em que foi feito o estudo, cidade e país; grau e cargo do autor; declaração de conflito de interesses; financiadora; endereço eletrônico do autor correspondente.

Resumo e Abstract:

- a. Artigos originais, de revisão, nota histórica e relato de caso: Até 250 palavras, contendo informação estruturada quanto a: Fundamento, objetivos, métodos, resultados, conclusão; palavras-chave e keywords: De acordo com os Descritores de Ciências da Saúde (<http://decs.bvs.br/>);
- b. Outras modalidades: sem resumo ou abstract, assim como sem palavras-chave e keywords.

Texto:

- a. Artigos originais: até 3.000 palavras, sem contar as referências, contendo: Introdução e objetivo; métodos (sujeitos e procedimentos), referência explícita quanto ao cumprimento das normas éticas aplicáveis, incluindo o nome da comissão de ética que aprovou o estudo e a obtenção do Consentimento Informado assinado; resultados; discussão; conclusão; agradecimentos; referências (até 40). Evitar repetir no texto dados que constem de tabelas e ilustrações;
- b. Artigos de revisão: até 5.000 palavras, sem contar as referências, contendo análise de dados de outros autores ou metanálise, avaliação crítica dos dados da literatura e considerações baseadas em sua experiência pessoal, outras informações semelhantes ao item anterior, referências (até 100);
- c. Nota histórica: até 2.500 palavras e até 30 referências;
- d. Relato de caso: até 1.000 palavras e até 15 referências. Deve conter referência explícita quanto ao cumprimento das normas éticas aplicáveis, incluindo o nome da comissão de ética que aprovou o estudo e a obtenção do Consentimento Informado assinado. [Sugere-se seguir o roteiro do CARE. <https://www.care-statement.org>]
- e. Imagens em neurologia: até 150 palavras, com resumo dos dados pertinentes e comentários sobre as imagens, referências (até 5).

Tabelas:

- a. Artigos originais e de revisão: Até cinco, apresentadas em páginas separadas, constando: número de ordem, título e legenda;
- b. Nota histórica: Até duas, com formato semelhante ao dos artigos.

c. Relato de caso: Uma, com formato semelhante ao dos artigos.

Ilustrações:

a. Artigos originais e de revisão: até seis gráficos e/ou fotos (excepcionalmente mais, a critério dos editores), de qualidade adequada para impressão, com legendas em páginas separadas;

b. Nota histórica: Até duas, com formato semelhante ao descrito para os artigos;

c. Relato de Caso: Até duas;

d. Imagens em neurologia: Até quatro, em uma única página. Obs.: Todas as figuras devem ser submetidas em formato JPG ou TIFF (300 dpi). Reproduções de ilustrações publicadas – informar sobre a autorização do detentor do direito, e caso se encontre em domínio público, citar a fonte. Obs.: O local de inserção de tabelas e figuras deve ser assinalado no texto.

Referências:

Seguir o estilo de referências Vancouver baseado nas normas do NLM http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html; as referências devem ser ordenadas de acordo com sua citação no texto (preferencialmente); incluir todos os autores quando até cinco; quando seis ou mais, listar os três primeiros seguidos de “et al.”.