



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE



Camila Farias Amorim

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBICIDA E
INFLAMATÓRIA DA LINHAGEM CELULAR
MIELOIDE NA INFECÇÃO PELO HTLV-1**

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBICIDA E
INFLAMATÓRIA DA LINHAGEM CELULAR
MIELOIDE NA INFECÇÃO PELO HTLV-1**

Camila Farias Amorim

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA.

A524 Amorim, Camila Farias

Avaliação da atividade microbicida e inflamatória da
linhagem celular mielóide na infecção pelo HTLV-1 / Camila
Farias Amorim – Salvador, 2013.

147 f.

Orientador: Prof. Dr. Edgar Marcelino de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Faculdade de Medicina da Bahia, 2013.

1. HTLV-1. 2. Monócitos. 3. Macrófagos. I. Carvalho,
Edgar Marcelino. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.98



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBICIDA E
INFLAMATÓRIA DA LINHAGEM CELULAR MIELOIDE NA
INFECÇÃO PELO HTLV-1

Camila Farias Amorim

Professor-orientador: Professor Dr. Edgar M. Carvalho

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, da área de concentração em Imunologia.

Salvador (Bahia), 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- Dr. Olindo Assis Martins Filho

Pesquisador Titular da Fundação Oswaldo Cruz e Chefe do Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ-Minas.

- Dr. Sérgio Marcos Arruda

Pesquisador Titular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ-Bahia e Professor da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

- Dra. Maria Ilma Andrade Santos Araújo

Pesquisadora do Serviço de Imunologia (SIM) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), professora permanente dos Programas de Pós-graduação em Imunologia (PPGIIm) e em Ciências da Saúde (PPGCS), UFBA, e professora adjunto 3 de Imunologia do curso de Medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, FBDC.

Membro Suplente:

- Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho

Professor Titular da Universidade Federal da Bahia.

“O conhecimento é a única coisa que nunca vão tirar de você.”

Zália Maria Farias Amorim e Aurélio Farias

*Dedico este trabalho a minha família, amigos
e namorado, por todo companheirismo e apoio
durante todo o processo.*

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Instituições

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Complexo do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES).
 - Serviço de Imunologia
 - Ambulatório Magalhães Neto – Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1.

EQUIPE

- Mariele Guerra Lemos da Silva, estudante de Iniciação Científica no Serviço de Imunologia.
- Maria de la Glória Orge, psicóloga do Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1.
- Dr. Anselmo de Santana Souza, doutor em Ciências da Saúde pela Universidade Federal da Bahia e estudante de Pós-doutorado no Serviço de Imunologia.
- Dra. Natália Barbosa Carvalho, doutora em Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais e estudante de Pós-doutorado no Serviço de Imunologia.
- Dra. Silvane Maria Braga Santos, doutora em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia.

FONTES DE FINANCIAMENTO

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- National Institutes of Health (NIH)
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT-DT)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Edgar Carvalho por me apresentar ao mundo da pesquisa científica, mundo este que pretendo continuar por toda minha carreira profissional. E simplesmente por me ensinar a PESQUISAR.

À Professora Dra. Silvane Braga por ter me acompanhado desde o início e me orientado durante todo desenvolvimento do projeto. Obrigada pelas manhãs e tardes de companheirismo em que trabalhamos e nos divertimos.

À Anselmo Souza, Angela Giudice, Natália Carvalho e Mariele Guerra por me ensinarem, me acompanharem em toda técnica desenvolvida nesse trabalho desde os experimentos até as estatísticas com muita paciência e dedicação. Obrigada por serem excelentes companheiros de laboratório, e ótimas companhias nos momentos de estresse.

À Glória Orge, Lucas Carvalho e Sara Passos que sempre estiveram por perto quando precisei, para tirar dúvidas inesperadas, dar apoio, ensinar ou incentivar.

À meus pais Paulo e Zália, por me incentivarem desde criança a estudar, sempre garantindo para eu nunca esquecer que “conhecimento é a única coisa que nunca vão tirar de você”.

À Iracema por ter me dado muito apoio durante os dois anos de trabalho, sempre se mostrando mãe quando a minha não estava por perto.

Aos meus amigos dos tempos da faculdade Danielle Pessôa, Pedro Costa, e Larissa Alencar por sempre estarem comigo, mesmo após a EBMS e me apoiarem nos caminhos que escolhi.

À Hauana Pedrão por ser minha melhor amiga.

À Augusto Carvalho por simplesmente ser o melhor companheiro, colega de trabalho e amigo que alguém pode desejar.

ÍNDICE

Índice de tabelas	14
Índice de figuras	15
Lista de abreviaturas	16
Resumo	18
Objetivos	19
Introdução	20
Revisão da literatura	22
1. Aspectos gerais e epidemiológicos	22
2. Estrutura genômica do HTLV-1	24
3. Resposta imune associada ao HTLV-1	27
4. Imunopatogênese e manifestações clínicas associadas ao HTLV-1	29
5. Resposta imune inata e células fagocíticas na infecção pelo HTLV-1	32
Casuística, material e métodos	38
1. Desenho experimental	38
2. Desenho de estudo e população estudada	39
3. Extração de DNA e carga proviral do HTLV-1	39
4. Obtenção e cultivo de células mononucleares do sangue periférico	40
5. Frequência de subpopulações de monócitos e expressão de moléculas co-estimulatórias de superfície celular	41
6. Cultivo e preparação da <i>Leishmania braziliensis</i>	43
7. Infecção de macrófagos com <i>Leishmania braziliensis</i>	43
8. Contagem de <i>L. braziliensis</i> para determinação da porcentagem de macrófagos infectados e quantidade de amastigotas intracelulares	43
9. Determinação das concentrações de citocinas e quimiocinas	44
10. Análise estatística	44
Resultados gerais	45
1) Casuística	45
2) Frequência de subpopulações de monócitos e expressão de moléculas co-estimulatórias de superfície celular	46
3) Avaliação da capacidade microbicida de macrófagos após infecção com	48

<i>Leishmania braziliensis</i>	
4) Perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1	50
5) Correlação entre a produção de IFN- γ por CMSPs e citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1	54
6) Correlação entre a carga proviral e a produção de citocinas e quimiocinas por CMSPs e macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1	55
Discussão	57
Perspectivas de estudos futuros	63
Sumário de resultados	65
Conclusões	66
Summary	67
Referências bibliográficas	68
Anexos	78
ANEXO 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	79
ANEXO 2. Ofício do Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira – UFBA	82
ANEXO 3. Manuscrito do artigo – Evaluation of microbicidal and inflammatory activity of myeloid cell lineage in HTLV-1 infection	84
ANEXO 4. Normas de publicação da revista PLOS Neglected of Infectious Diseases	122

INDICE DE TABELAS

TABELA 1. Idade e gênero dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios. 45

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Distribuição geográfica dos principais focos da infecção pelo HTLV-1.	23
FIGURA 2. Desenho esquemático da estrutura do HTLV-1.	24
FIGURA 3. Organização genômica do HTLV-1.	26
FIGURA 4. Representação das subpopulações de monócitos, utilizando os marcadores CD14 e CD16.	35
FIGURA 5. Esquema representativo da seleção de monócitos e suas subpopulações.	42
FIGURA 6. Frequência das subpopulações de monócitos (clássico, intermediários e não-clássicos) e expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 em monócitos de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 e controles saudáveis.	46
FIGURA 7. Percentagem de macrófagos infectados por <i>L. braziliensis</i> e número de amastigotas intracelulares.	48
FIGURA 8. Concentrações de TNF- α e IL-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos.	50
FIGURA 9. Concentrações de CXCL9, CXCL10 e CCL5 no sobrenadante de cultura de macrófagos.	52
FIGURA 10. Correlação entre a carga proviral e a produção de IFN- γ , TNF- α , CXCL9 e CXCL10 por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1.	55

LISTA DE ABREVIATURAS

APC – antigen-presenting cell (Célula apresentadora de antígeno)

ATL – Adult T-cell leukemia (Leucemia/linfoma de células T do adulto)

CMSP – Células mononucleares do sangue periférico

DCs – Dendritic cells (Células dendríticas)

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – Enzyme Linked Immunoabsorbent assay (Ensaio imunoenzimático)

GLUT1 – Glucose transporter 1 (Transportador de glicose 1)

GM-CSF - Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos e Granulócitos)

HAM/TSP – HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical)

HBZ – HTLV-1 bZIP fator, HTLV-1 basic leucine zipper fator (fator básico em leucina do HTLV-1)

HTLV – Human T lymphotropic virus (Vírus linfotrópico de células T humanas)

IFN- α,β,γ – Interferon α,β,γ

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleukin (Interleucina)

LPS – Lipopolissacarídeo

MHC classe I e II – Major histocompatibility complex class I and II (Complexo de histocompatibilidade principal classe I e II)

MIF – Média de intensidade de fluorescência

NBT - Nitro-blue tetrazolium test

RNA – Ácido ribonucleico

T CD4 e T CD8 – Cluster differentiation-4 and 8 (Grupo de diferenciação de células T CD4 e TCD8)

TLR – Toll-like receptor

TNF- α – Tumor necrosis fator (Fator de necrose tumoral)

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBICIDA E INFLAMATÓRIA DA LINHAGEM CELULAR MIELOIDE NA INFECÇÃO PELO HTLV-1. O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) infecta predominantemente células T induzindo proliferação e ativação linfocitária. Pouco se sabe sobre a função de monócitos e macrófagos na infecção pelo HTLV-1. Indivíduos infectados pelo HTLV-1 têm mais susceptibilidade à outros agentes infecciosos intracelulares. A ativação de macrófagos e destruição destes agentes é o principal mecanismo de defesa contra patógenos intracelulares. **Objetivos:** Avaliar a frequência das subpopulações de monócitos e expressão de moléculas co-estimulatórias nestas células, assim como a habilidade que macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 têm de matar um parasita intracelular e produzir citocinas e quimiocinas. **Métodos:** Participaram deste estudo 26 indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem e com HAM/TSP e 19 controles sadios não infectados pelo vírus. As frequências das subpopulações de monócitos e expressão de moléculas co-estimulatórias foram realizadas através de citometria de fluxo. Macrófagos foram infectados com *L. braziliensis* ou estimulados com LPS. A porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas em 100 macrófagos foram avaliados por microscopia óptica. As determinações de citocinas e quimiocinas foram realizadas pela técnica de ELISA, em sobrenadante destas células. **Resultados:** Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à frequência das subpopulações de monócitos ou sua ativação. Macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram infectados pela *L. braziliensis* na mesma proporção que macrófagos de controles sadios, e os dois grupos obtiveram a mesma habilidade de matar este parasita. Macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produziram espontaneamente ou após estímulo mais TNF- α , CXCL9, CXCL10 e CCL5 do que macrófagos de controles sadios, além de apresentarem uma diminuição na produção de IL-10. **Conclusão:** Macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 têm preservada a capacidade microbicida e produzem maior quantidade de citocinas e quimiocinas espontaneamente ou após estímulo. Há uma dissociação entre a resposta inflamatória e a capacidade microbicida de macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Palavras-chave: 1. HTLV-1; 2. Monócitos; 3. Macrófagos; 4. Resposta imune inata

OBJETIVOS

Geral

Avaliar a função de células da linhagem mielóide (monócitos e macrófagos) de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.

Específicos

- Avaliar a frequência de subpopulações de monócitos e a expressão de moléculas co-estimulatórias nas células de indivíduos infectados pelo HTLV-1.
- Avaliar a atividade microbicida de macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 após infecção por *Leishmania braziliensis*.
- Avaliar a produção de TNF- α , IL-10, CXCL9, CXCL10 e CCL5 por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) infecta cerca de 15 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo, tendo focos endêmicos em praticamente todos os continentes (Edlich *et al.*, 2003; Proietti *et al.*, 2005). No Brasil, a cidade de Salvador – Bahia é um dos principais focos desta infecção, onde se estima que 40.000 pessoas estejam infectadas (Dourado *et al.*, 2003). Uma grande parcela de indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanece assintomática até o final da vida, contudo poucas pessoas irão desenvolver uma doença linfoproliferativa maligna denominada leucemia/linfoma de células T adultas (ATL) (Uchiyama *et al.*, 1997; Poiesz *et al.*, 1980) ou uma doença inflamatória neurodegenerativa crônica, a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) (Gessain *et al.*, 1985; Osame, 2002). Adicionalmente tem sido descrito que mais de 40% dos indivíduos infectados apresentarão doenças ou manifestações clínicas associadas ao vírus como dermatite infecciosa (LaGrenade *et al.*, 1990), polimiosite (Morgan *et al.*, 1989), síndrome seca (Giozza *et al.*, 2008; Eguchi *et al.*, 1992), disfunção erétil e/ou bexiga hiperativa (Castro *et al.*, 2005 e 2007), periodontite crônica (Garlet *et al.*, 2010), artropatia associada ao HTLV-1 e outras manifestações neurológicas (Siqueira *et al.*, 2009, Caskey *et al.*, 2007, Souza *et al.*, 2012).

A infecção pelo HTLV-1 está associada com uma elevada proliferação e ativação espontânea de células do sistema imune, principalmente de células T, com alta produção e secreção de mediadores inflamatórios (tais quais citocinas e quimiocinas, como por exemplo, TNF- α , IFN- γ , CXCL9, CXCL10). Muitos estudos têm voltado a atenção para o papel destas células na infecção pelo HTLV-1 (Santos *et al.*, 2004; Itoyama *et al.*, 1998), e procuram correlacionar as disfunções do sistema imunológico adaptativo com o desenvolvimento das doenças ou manifestações clínicas associadas ao vírus.

Apesar da ocorrência de uma resposta imune exagerada, as co-infecções com outros agentes patogênicos são relatadas com frequência nos indivíduos infectados por esse vírus. Tem sido documentado que uma porcentagem significativa de indivíduos infectados pelo HTLV-1 encontra-se co-infectada com *Strongyloides stercoralis* (Porto *et al.*, 2001), *Schistosoma mansoni* (Porto *et al.*, 2004), *Mycobacterium tuberculosis* (Pedral-Sampaio *et al.*, 1997; Marinho *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2009 e 2012), vírus da hepatite C (Kishihara *et al.*, 2001) e bactérias dermatotrópicas (LaGrenade *et al.*, 1990) ou orais (Martins *et al.*, 2010).

Indivíduos infectados pelo HTLV-1 além de maior susceptibilidade à outras infecções, apresentam quadros mais graves de doença. Por exemplo, a co-infecção do HTLV-1 com o *M. tuberculosis* aumenta de 2 a 4 vezes o risco de desenvolver tuberculose; há maiores chances de desenvolver a forma mais grave da tuberculose e aumenta a mortalidade da tuberculose (Pedral-Sampaio *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 2009 e 2012)

A maioria dos estudos experimentais aborda a resposta imune adaptativa na infecção pelo HTLV-1, mas até o presente momento poucos estudos foram conduzidos com o objetivo de avaliar a imunidade inata nesta infecção. Especula-se que haja alguma disfunção nas células da resposta imune inata na infecção pelo HTLV-1 que prejudica o desenvolvimento de uma resposta eficaz contra outros microrganismos patogênicos. A produção exagerada de citocinas, quimiocinas e outros mediadores pró-inflamatórias poderiam interferir e influenciar na função das células da linhagem mielóide (monócitos e macrófagos). É possível que a constante estimulação destas, leve-as a um grau de exaustão, interferindo assim na capacidade microbicida. No presente estudo foi avaliada a frequência das subpopulações de monócitos e a expressão de moléculas co-estimulatórias nestas células, além da habilidade fagocítica e microbicida de macrófagos, após infecção com *Leishmania braziliensis* (um microrganismo intracelular), assim como o perfil inflamatório e regulatório destas células (através da produção citocinas e quimiocinas).

REVISÃO DA LITERATURA

1. ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS

O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus a ser descrito no mundo (1980), isolado de um paciente com diagnóstico de linfoma cutâneo de células T (Poiesz *et al.*, 1980). Posteriormente, outros três tipos deste retrovírus foram detectados e isolados: o HTLV-2 em 1982 no Japão, o HTLV-3 e o HTLV-4 ambos em 2005 na África (Kalyanaraman *et al.*, 1982; Calattini *et al.*, 2005; Wolfe *et al.*, 2005).

Estima-se que 15 a 20 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo vírus (Edlich *et al.*, 2003), e as principais áreas endêmicas da infecção pelo HTLV-1 são na África (África do Sul, Namíbia, Nigéria, etc.), América do Sul e Central (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Peru e Venezuela), Caribe, Japão e Oriente Médio (Proietti *et al.*, 2005). O HTLV-1 foi identificado pela primeira vez no Brasil em 1986 em imigrantes japoneses que moravam na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (Kitagawa *et al.*, 1986). Desde 2006 estima-se que 2,5 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 no Brasil (Carneiro-Proietti *et al.*, 2006) (Figura 1).

Um estudo de base populacional em Salvador, Bahia, envolvendo 1.385 indivíduos apontou que 1,76% destes estavam infectados pelo HTLV-1 (com razão de incidência de 2% para mulheres e 1,2% para homens, aumentando para 6,3% e 9% respectivamente em indivíduos com mais de 50 anos). Estima-se que na cidade de Salvador aproximadamente 40.000 indivíduos estão infectados pelo HTLV-1 (Dourado *et al.*, 2003). Entre doadores de sangue, a prevalência da infecção pelo HTLV-1 é de 0,48% (Proietti *et al.*, 2005). O vírus é transmitido de três maneiras: sexual, sanguínea (transfusão de sangue ou uso de agulhas e/ou seringas contaminadas) e vertical principalmente pelo aleitamento materno (Proietti *et al.*, 2005). Dentre os grupos de risco, os mais destacados são filhos de gestantes infectados pelo vírus e usuários de drogas injetáveis, com prevalência em Salvador de 0,9% e 25,5% respectivamente (Dourado *et al.*, 1999; Bittencourt *et al.*, 2001). Além destes fatores de risco outros também estão associados à infecção, como por exemplo, sexo feminino, baixa renda, menor grau de escolaridade e presença de doenças sexualmente transmissíveis (Mota *et*

al., 2007). Entre os indivíduos infectados com HIV-1 estima-se uma prevalência de 7,1% de infecção pelo HTLV-1 em Salvador (Andrade *et al.*, 2001).

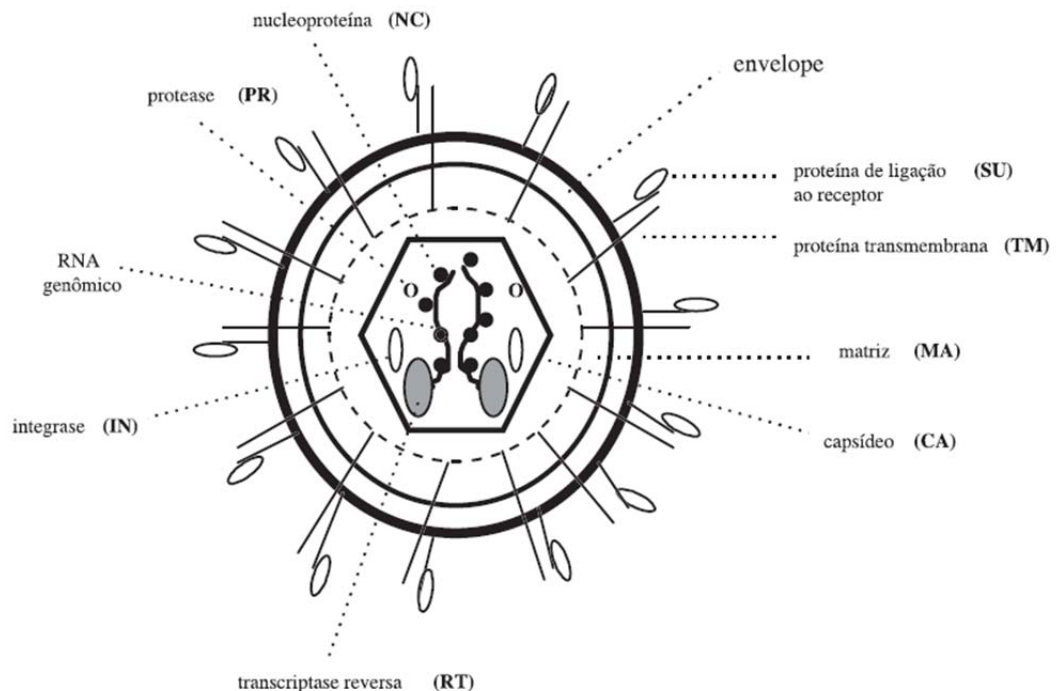
Figura 1. Distribuição geográfica dos principais focos da infecção pelo HTLV-1. Especulação do número de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com base em aproximadamente 1.5 bilhões de pessoas residentes das áreas endêmicas. Dados obtidos de estudos realizados com populações de mulheres grávidas e/ou doadores de sangue e/ou diferentes população de adultos. (Figura de Gessain A. & Cassar O., 2012 - modificada)



2. ESTRUTURA GENÔMICA DO HTLV-1

O HTLV-1 possui características estruturais similares à de outros retrovírus conhecidos atualmente, composto por um envelope, um capsídeo e um núcleo. Este envelope é composto por proteínas de superfície extracelular, transmembrana e de matriz (gag). O capsídeo é responsável por conter proteínas codificadas pelo gene gag e o genoma viral, que é composto por duas fitas RNA diméricas senso positivo. Além das proteínas citadas, outras também estão presentes dentro do capsídeo: a transcriptase reversa e integrase (ambas fundamentais no processo de integração ao material genético da célula hospedeira) (Wycuff *et al.*, 2001; Proietti, 2010) (Figura 2).

Figura 2. Desenho esquemático da estrutura do HTLV-1. (Figura de Proietti, Caderno Hemomínas HTLV pag 14, 2010)

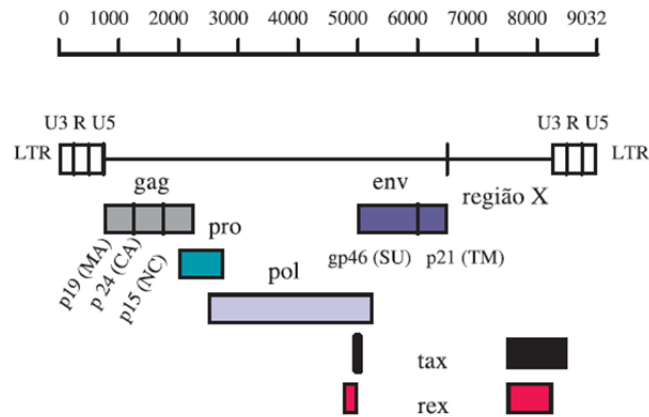


O ciclo de multiplicação viral também se assemelha aos demais retrovírus. Na internalização do vírus estão responsáveis o domínio de ligação ao receptor e o receptor de

membrana celular GLUT1. A proteína transmembrana presente no envelope do vírus irá se fundir à membrana celular da célula hospedeira permitindo que o material genético do HTLV-1 seja internalizado. Ainda no citoplasma celular, o RNA do vírus se converte em DNA pela ação da proteína transcriptase reversa, e só então migra para o núcleo. A integrase será responsável por inserir o DNA viral ao DNA hospedeiro, de maneira a promover a transcrição deste por enzimas da própria célula. Ocorrerá então a síntese de RNA viral tendo como DNA molde o provírus integrado, formando os mRNAs e RNA genômico. As proteínas são sintetizadas nos ribossomos a partir dos mRNAs. Na etapa de empacotamento, a incorporação do tRNA ao genoma servirá como iniciador para a síntese da fita negativa de DNA. O processamento dos precursores Gag e Gag-Pro-Pol está relacionada com as etapas de montagem e brotamento, etapas estas, reguladas e controladas no intuito de impedir a clivagem antes da montagem (a maturação é essencial para a formação de uma partícula com poder infeccioso). Por fim, ocorre o processamento proteolítico das proteínas do capsídeo, resultando em uma partícula viral infecciosa madura, capaz de invadir outras células (Wycuff *et al.*, 2001; Manel *et al.*, 2005a).

O RNA genômico do HTLV-1 possui organização similar aos demais retrovírus. Há presença dos genes gag (cuja função é codificar proteínas estruturais da matriz, capsídeo e núcleo), env (codifica proteínas do envelope), pol e pro (ambas responsáveis por gerar produtos de atividade enzimática do retrovírus). Além destes genes, há também a região X no mRNA, que está associada com a produção das proteínas Tax e Rex. Já se têm estabelecido que Tax esteja relacionada com a transcrição do provírus, desregula fatores reguladores do ciclo celular e imortaliza células T, enquanto Rex modula o transporte de RNA viral. Além do gene Tax interferindo em etapas do ciclo celular, o gene HBZ (transcrito por fita negativa) também está intimamente associado à proliferação de células (Figura 3).

Figura 3. Organização genômica do HTLV-1. O genoma proviral está representado com as indicações das posições dos genes conhecidos e seus produtos proteicos. (Figura de Proietti, Caderno Hemominas HTLV v. XIII, pag 17, 2010)



A transmissão do DNA proviral ocorre de duas maneiras: através da proliferação da célula infectada, com passagem deste DNA da célula mãe para a célula filha; ou por um mecanismo de “sinapse viral”, com o vírus induzindo atração de células e facilitando a junção destas, ocorrendo então a passagem do material genético para a célula não infectada (Bangham, 2003).

3. RESPOSTA IMUNE ASSOCIADA AO HTLV-1

A resposta imune do hospedeiro ao HTLV-1 é típica de defesa contra agentes intracelulares. Na fase inicial contra infecções por vírus (resposta imune inata), a regulação e estimulação são feitas por citocinas (Interferons tipo I: IFN- α e β) que protegem e aumentam a resistência de células à entrada do vírus, células NK (*natural killers*) e macrófagos. Macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos (APCs) também são responsáveis por produzirem citocinas que têm a propriedade de ativar células NK, contribuindo assim com sua capacidade citotóxica e produção de IFN- γ , citocina responsável pela ativação de macrófagos, tornando-os competentes para exercerem ação contra a infecção.

O primeiro estudo que abordou a associação direta entre a infecção pelo HTLV-1 e os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) foi publicado em 2010 e, demonstrou que células dendríticas plasmocitóides infectadas por vírions do HTLV-1 eram responsáveis por uma forte resposta imune inata com alta produção de IFN- α dependente de TLR7 (Colisson *et al.*, 2010).

Macrófagos, assim como neutrófilos, ativados têm a capacidade de produzir espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HOCl), o óxido nítrico (NO) e o superóxido (O_2^-), através do *burst* respiratório, além de enzimas proteolíticas em resposta a microrganismos intracelulares no intuito de destruí-los ou inibir o seu crescimento (Forman & Torres, 2001a e 2001b; Liew *et al.*, 1990; Trinchieri & Gerosa, 1996; Bogdan, 2001).

Na resposta imune adaptativa, as APCs são responsáveis por apresentarem antígenos virais às células T através do complexo principal de histocompatibilidade classe I e II (MHC classe I e II). As células T de fenótipo $CD8^+$ e $CD4^+$ que reconhecerão os antígenos virais associados ao MHC classe I e II respectivamente, serão estimuladas a atuarem de forma distinta, porém resultam no controle da infecção. Células T $CD8^+$ participam do mecanismo de defesa através da citotoxicidade, liberando granzimas e perforinas que destroem as células infectadas e também o vírus, e as células T $CD4^+$ colaboram com as células B na produção de anticorpos e liberam de citocinas que ativam células T $CD8^+$, monócitos e macrófagos. A função efetora da resposta imune adaptativa nas infecções intracelulares é predominantemente

moldada por células T CD8⁺. Estas células podem ter atividade citotóxica, inflamatória e moduladora.

Embora as células T CD8⁺ possuam a capacidade de destruir células infectadas pelo HTLV-1, esta citotoxicidade é feita predominantemente contra células TCD4⁺ expressando a proteína Tax (Hanon *et al.*, 2000). Nos pacientes com HAM/TSP têm sido observado que esta citotoxicidade é menos eficiente (Kattan *et al.*, 2009). A diminuição da eficiência da citotoxicidade tem sido atribuída ao aumento da expressão de HBZ e diminuição da expressão de Tax (Macnamara *et al.*, 2010). Como a avidéz de ligação das células T CD8⁺ com o HBZ é inferior à observada com Tax, a expressão de HBZ faz com que o vírus escape da resposta imune protetora. Todavia, o HBZ induz também ativação e proliferação celular, gerando nos pacientes com HAM/TSP uma elevada atividade inflamatória de células T CD8⁺, a despeito de sua menor capacidade citotóxica entre as células infectadas pelo vírus.

Anticorpos contra o HTLV-1 são produzidos durante a infecção viral e estes anticorpos são utilizados para a detecção da infecção pelo HTLV-1 pela técnica de ELISA e confirmação da infecção pela técnica de Western blot. Anticorpos não participam do mecanismo de defesa contra o vírus na primeira infecção, mas através de mecanismos de neutralização os anticorpos impedem a infecção pelo viral, sendo este o principal mecanismo de proteção contra o vírus pela vacinação. Todavia, não existem vacinas eficazes contra a infecção pelo HTLV-1.

4. IMUNOPATOGENESE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS AO HTLV-1

O HTLV-1 infecta preferencialmente células T CD4⁺, mas sabe-se que *in vitro* outras células também são infectadas com sucesso: células T CD8⁺ (Manel *et al.*, 2005b), células B (Koyanagi, 1993; Fan *et al.*, 1992), células dendríticas (Macatonia *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 2008; Merl *et al.*, 1984), células endoteliais (Ho *et al.*, 1984), células da glia (Saida *et al.*, 1988) e monócitos/macrófagos (Koralnik, 1992; de Revel *et al.*, 1993). Porém, apesar do seu variado tropismo celular, a infecção pelo HTLV-1 não necessariamente vai causar doença. Aproximadamente 4% dos indivíduos infectados irão desenvolver uma doença linfoproliferativa maligna chamada leucemia/linfoma de células T adultas (ATL) (Uchiyama *et al.*, 1997; Poiesz *et al.*, 1980), ou uma doença inflamatória neurodegenerativa crônica, a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) (Gessain *et al.*, 1985; Osame, 2002). Além dessas duas patologias, a infecção pelo HTLV-1 está associada a uma série de manifestações clínicas incluindo a dermatite infecciosa (LaGrenade *et al.*, 1990), polimiosite (Morgan *et al.*, 1989), síndrome seca (Giozza *et al.*, 2008; Eguchi *et al.*, 1992), disfunção erétil e/ou bexiga hiperativa (Castro *et al.*, 2005 e 2007), periodontite crônica (Garlet *et al.*, 2010), artropatia associada ao HTLV-1 e outras manifestações neurológicas (Siqueira *et al.*, 2009, Caskey *et al.*, 2007, Souza *et al.*, 2012).

Alguns fatores irão estabelecer ou determinar o curso da infecção como, por exemplo, a resposta imune do hospedeiro frente à infecção viral (principalmente a resposta das células T CD8⁺), além de fatores genéticos individuais, como polimorfismos de genes HLA e genes relacionados com a resposta imune (Haddad *et al.*, 2011).

Um importante elemento associado com a patogênese pelo HTLV-1 é a proteína Tax. Como já dito anteriormente, esta proteína está envolvida com a replicação viral (por estimular a expressão de genes virais através de sua interação com fatores celulares e a região LTR da extremidade do genoma proviral – *long terminal repeats*, essenciais na integração do DNA proviral no DNA cromossômico do hospedeiro). Além disso, a proteína Tax associada a fatores transcricionais e moléculas de sinalização gera estímulo ou repressão de genes celulares, como exemplo, induz o aumento da expressão de várias citocinas e receptores envolvidos no crescimento e proliferação de células T (Itoyama *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 1990;

Tschachler *et al.*, 1993). A proteína Tax também é capaz de inibir a expressão de genes celulares que atuam como inibidores do crescimento celular, promotores do reparo do DNA, e promotores de apoptose (Franchini & Streicher, 1995; Franchini, 1995; Ferreira *et al.*, 1997; Mesnard & Devaux, 1999; Yoshida, 2001).

Nos últimos anos, atenção especial com relação aos genes responsáveis pela patogênese do HTLV-1 tem sido dada para o gene HBZ, transcrito pela fita negativa do provírus. A expressão deste gene é de 20-50 vezes menor do que o mRNA para Tax, porém o HBZ é expresso com maior frequência em células de paciente com ATL, e está relacionada com o desenvolvimento de tumores e eventos inflamatórios (Satou *et al.*, 2006; Mesnard *et al.*, 2006). Além de ser detectado em células de indivíduos com ATL, este gene também é expresso em células de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 e tem sido relacionado à patogênese da HAM/TSP, pois a sua expressão esta intimamente ligada com a elevação da carga proviral, expressão de marcadores inflamatórios e gravidade da doença (Saito *et al.*, 2009).

A HAM/TSP é uma doença inflamatória que acomete principalmente indivíduos com mais de 40 anos de idade, preferencialmente do sexo feminino. A patogênese desta manifestação clínica é desencadeada pela Tax e está relacionada com a invasão das células infectadas no sistema nervoso central (SNC) e o desencadeamento de uma resposta inflamatória local crônica. Tax é responsável por aumentar a expressão de receptores para IL-2 resultando na intensa proliferação celular e produção de citocinas. Com esses eventos acontecendo persistentemente, células infectadas (principalmente células T CD4⁺ e T CD8⁺) permanecem hiperativadas, produzindo citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-5, IL-10 em quantidades elevadas (Yoshida, 2001). Um estudo em Salvador, Bahia, comparou a resposta imune de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 com indivíduos com mielopatia associada ao HTLV-1 e demonstrou que a produção de citocinas pró-inflamatórias deste segundo grupo foi consideravelmente superior ao dos infectados sem doença (Santos *et al.*, 2004). Células T CD4⁺ e outras células infectadas têm a capacidade de migrar para a medula espinhal e produzir citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-6), capazes de lesar e causar os danos teciduais observados na HAM/TSP (Kubota *et al.*, 1998; Osame, 2002). A mielopatia associada ao HTLV-1 é caracterizada como uma síndrome de desmielinização de início insidioso, com rigidez ou fraqueza progressiva dos membros inferiores, espasticidade e hiperreflexia. Os indivíduos tendem a apresentar dor lombar, leves sintomas sensitivos,

incontinência urinária, e com a evolução da doença constipação intestinal, diminuição da libido e da potência sexual (Carneiro-Proietti *et al.*, 2002).

Além de a proteína Tax interferir no processo patogênico da HAM/TSP outro fator tem sido relacionado com a progressão do status assintomático para o desenvolvimento da doença neurodegenerativa: a carga proviral de indivíduos diagnosticados com HAM/TSP é consideravelmente superior quando comparada à carga proviral de portadores assintomáticos (Nagai *et al.*, 1998; Olindo *et al.*, 2005).

Na ATL, a patogênese está relacionada com a capacidade transativadora de Tax, resultando no descontrole do processo de proliferação celular. Com Tax estimulando a proliferação celular contínua, algumas alterações genéticas podem acontecer em genes importantes da célula hospedeira, responsáveis por manter a apoptose e ciclo celular regulados. Essas alterações (mutações) podem converter as células infectadas em neoplásicas, com alto poder proliferativo e de expansão clonal, levando ao desenvolvimento da ATL. A ATL possui quatro formas clínicas da doença: a forma aguda, que se manifesta com leucemia aguda, grande quantidade de linfócitos atípicos no sangue periférico, hipercalcemia, lesões cutâneas e hepatoesplenomegalia; a forma linfomatosa, observando-se linfadenomegalia sem linfocitose; a forma indolente, caracterizada pela presença de 5% ou mais de linfócitos T anormais no sangue periférico, ausência de linfocitose e de hipercalcemia, desidrogenase láctica (LDH) aumentada até 1,5 vezes o valor normal, e os únicos órgãos envolvidos podem ser pele e/ou pulmões; a forma crônica é caracterizada por linfocitose absoluta, LDH até duas vezes o valor normal, sem hipercalcemia, derrames cavitários, os órgãos internos podem estar envolvidos à exceção de sistema nervoso central, ossos e trato gastrointestinal (Shimoyama, 1991).

5. RESPOSTA IMUNE INATA E CÉLULAS FAGOCÍTICAS NA INFECÇÃO PELO HTLV-1

Embora a resposta imune adaptativa seja bem estudada na infecção pelo HTLV-1 (Santos *et al.*, 2004; Itoyama *et al.*, 1998), poucos estudos têm voltado à atenção para o papel das células da resposta imune inata nesta infecção (Journo & Mahieux, 2011).

As células dendríticas (DCs), um dos componentes celulares da resposta imune inata, podem ser infectadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* pelo HTLV-1 (Macatonia *et al.*, 1992; Hishizawa *et al.*, 2004). Em 2008, um estudo mostrou que ambas as linhagens de células dendríticas (mielóide e plasmocitóide) podem ser infectadas por partículas virais do HTLV-1 e, além disso, ter capacidade infectiva podendo transmitir o vírus para outras células (principalmente células T) através do contato célula-célula (Jones *et al.*, 2008). Estes dados contribuíram no entendimento de que as DCs, presentes nos sítios da infecção, podem ser uma das primeiras células-alvo em indivíduos recém-infectados, e a partir delas outras células também se infectariam (Jones *et al.*, 2008).

O papel destas células na infecção pelo HTLV-1 ainda não está totalmente esclarecido. Estudos *in vivo* demonstraram que DCs plasmocitóides infectadas por partículas virais do HTLV-1 são capazes de gerar resposta imune inata com produção exacerbada de IFN- α (Colisson *et al.*, 2010). Além disso, a infecção pelo vírus estaria associada à elevada expressão de TLR7 e TRAIL, um fator indutor de apoptose (Colisson *et al.*, 2010). Ao contrário deste estudo *in vivo*, foi observado que células dendríticas plasmocitóides *ex vivo* de pacientes infectados pelo HTLV-1 possuem uma capacidade reduzida de produzir IFN- α , e este fato estaria associado à elevada carga proviral (Hishizawa *et al.*, 2004). Esta observação aponta para ideia de que o HTLV-1 possui mecanismos de evasão que comprometem algumas funções das DCs, como a produção de IFN do tipo I. Este mecanismo de evasão pode facilitar a disseminação do vírus e impedir que o sistema imune inato possa montar uma resposta adequada à infecção.

Adicionalmente, outros estudos avaliaram em DCs o aumento da expressão de moléculas associadas com a internalização do vírus e com a adesão às células T (DC-SIGN), contribuindo assim para o entendimento do papel das DCs em transferir o vírus para outras células (Jain *et al.*, 2009; Svajger *et al.*, 2010).

Foi demonstrado em ensaios *in vitro* que há uma diminuição na expressão de CD14 e CD1a, moléculas relacionadas com a maturação de DCs derivadas de monócitos (Nascimento *et al.*, 2011; Makino *et al.*, 2000). Além disso, moléculas co-estimulatórias, como CD83, CD86, HLA-DR tinham sua expressão aumentada em DCs de indivíduos não infectados pelo vírus após estímulo com TNF- α , enquanto em DCs de indivíduos infectados pelo HTLV-1 não houve o aumento da expressão destas moléculas após estímulo com TNF- α (Nascimento *et al.*, 2011). Neste mesmo estudo, foi observado que estas DCs de indivíduos infectados pelo HTLV-1 tinham uma capacidade reduzida de estimular linfócitos T não infectados pelo vírus (Nascimento *et al.*, 2011).

Sabendo-se que uma das vias importantes de transmissão do HTLV-1 é a vertical (através do aleitamento materno), um recente estudo também relatou que monócitos CD14⁺ co-cultivados com macrófagos infectados pelo HTLV-1 provenientes de leite materno e estimulados com GM-CSF e IL-4, não se diferenciam em DCs maduras e apresentam diminuição da expressão de CD1a, CD1b, CD11b, DC-SIGN e HLA-DR, responsáveis pela estimulação da proliferação de células T, aumento da expressão de CD1d e CD86 (Inagaki *et al.*, 2012).

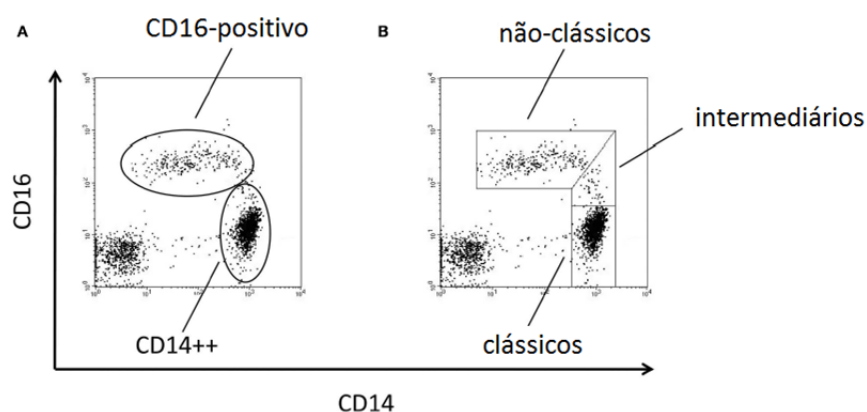
Os neutrófilos também estão na linha de defesa inicial contra agentes invasores (bactérias, fungos, protozoários, etc.), sendo essenciais na desenvoltura da resposta imune inata do hospedeiro. São as primeiras células a serem recrutadas aos sítios de infecção e possuem papel fundamental na prevenção da sobrevivência do patógeno através de mecanismos oxidantes e dependentes de proteases (Faurischou & Borregaard, 2003; Nauseef, 2007). Contudo, o papel de neutrófilos na defesa contra infecções virais não é esclarecido. Sabe-se que na infecção pelo HTLV-1 ocorre um aumento da ativação espontânea de neutrófilos tanto em portadores do vírus como em pacientes com HAM/TSP quando comparada com indivíduos soronegativos, avaliado pelo *Nitro-blue tetrazolium* ou NBT (Guerreiro *et al.*, 2005). Em 2011, o mesmo grupo avaliou a função de neutrófilos na infecção pelo HTLV-1 e documentou que neutrófilos de indivíduos infectados pelo vírus apresentavam um perfil de ativação elevado comparados aos neutrófilos de controles não infectados pelo vírus (diminuição de neutrófilos expressando CD62L e maior expressão de CD66b). Todavia, neutrófilos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 eliminam patógenos intracelulares (*Leishmania amazonensis*) da mesma forma que neutrófilos de indivíduos não infectados pelo vírus (Bezerra *et al.*, 2011).

As quimiocinas (citocinas de baixo peso molecular) também têm papel essencial na resposta imune inata e adaptativa, devido a sua capacidade de estimular a migração/infiltração de células, como os linfócitos T, aos sítios de infecção (Baggiolini *et al.*, 1994; Oppenheim *et al.*, 1991; Rossi & Zlotnik, 2000).

Sabe-se que na infecção pelo HTLV-1, uma grande variedade de linhagens celulares expressam quimiocinas, tais quais a CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 e CXCL10 (Baba *et al.*, 1996). As quimiocinas também têm a capacidade de atrair células T ativadas ao sistema nervoso central (SNC) e a alta concentração destas no soro e líquido cefalorraquidiano está relacionada com processos inflamatórios (como por exemplo, na encefalite autoimune e na esclerose múltipla) (Fife *et al.*, 2001; Trebst & Ransohoff *et al.*, 2001). Estudos mostraram que há uma alta produção de CXCL10 e CXCL9 e baixa produção de CCL2 no líquido cefalorraquidiano de pacientes infectados pelo HTLV-1 com diagnóstico para HAM/TSP (Narikawa *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2013; Guerreiro *et al.*, 2006).

Os monócitos têm papel fundamental na primeira linha de defesa contra agentes infecciosos e estão presentes na circulação sanguínea, sendo precursores de macrófagos, células importantes na inflamação tecidual. Os monócitos constituem uma população heterogênea de células que podem ser diferenciadas com base na expressão de CD14 (receptor para LPS) e CD16 (receptor de baixa afinidade para IgG). Os monócitos clássicos eram tradicionalmente classificados como células com alta expressão de CD14 (CD14⁺⁺ CD16⁻), constituindo 90% de todos os monócitos circulantes do sangue periférico; enquanto os monócitos não-clássicos eram classificados a partir da co-expressão de CD16 e CD14 (CD14⁺ CD16⁺⁺), constituindo 10% dos monócitos circulantes (Passlick *et al.*, 1989). Recentemente Ziegler-Heitbrock e cols propuseram uma nova definição das subpopulações monocíticas, depois da identificação por citometria de fluxo, que além das duas populações tradicionais (clássicos e não-clássicos), havia uma terceira subpopulação que foi denominada de monócitos intermediários (CD14⁺ CD16⁺) (Ziegler-Heitbrock *et al.*, 2010) (Figura 4). Estudos seguintes mostraram que os monócitos intermediários possuem funções e características distintas das encontradas nas outras duas subpopulações, por exemplo, os monócitos intermediários produzem mais TNF- α do que os monócitos clássicos e não-clássicos (Costa, 2012).

Figura 4. Representação das subpopulações de monócitos, utilizando os marcadores CD14 e CD16. Em A, está representado a estratégia convencional para classificação de monócitos clássicos e não clássicos; e em B a nova estratégia de classificação de monócitos, com adição de células intermediárias. (Ziegler-Heitbrock & Hofer, 2013 – modificado)



O papel dos monócitos e macrófagos na infecção pelo HTLV-1 ainda é pouco abordado na literatura. Sabe-se que estas células são infectadas pelo vírus tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Koralnik, 1992; Koyanagi, 1993; de Revel *et al.*, 1993). Estudo conduzido por um grupo no Japão mostrou, em um modelo *in vitro*, que macrófagos têm um papel fundamental na estimulação da produção de citocinas por outras células (Arima *et al.*, 1992). A depleção de macrófagos em culturas de células tumorais de pacientes com ATL resultou em uma diminuição acentuada da produção de IL-2 por células T, e a adição dos macrófagos reconstituiu a produção de IL-2 nestas mesmas culturas. Adicionalmente, a adição de IL-6 e IL-1 (citocinas produzidas por macrófagos) também reconstituiu a produção de IL-2 nas culturas depletadas de macrófagos (Arima *et al.*, 1992). Sabe-se que a IL-2 é produzida por células T e influencia as próprias células T a proliferarem e se diferenciarem em células efetoras ou de memória, além de induzir sobrevivência celular. Estes dados demonstraram a importância dos macrófagos na immortalização de células T infectadas pelo HTLV1 e no desenvolvimento da ATL.

Recentemente um estudo mostrou que monócitos de pacientes com HAM/TSP apresentavam maior expressão de CX3CR1 e HLA-DR, e maior produção de TNF- α e IL-1 β do que indivíduos assintomáticos e controles saudáveis. Além disso, os autores utilizaram um inibidor de fagócitos mononucleares, a minociclina, e documentaram que esta molécula diminuía a expressão de TNF- α por células CD14⁺, e que a adição desse composto em cultura

de células mononucleares do sangue periférico diminuía a produção de IL-1 β no sobrenadante (Enose-Akahata *et al.*, 2012). A minociclina também inibiu proliferação espontânea de células T CD8⁺ de pacientes com HAM/TSP e produção de IFN- γ por estas células (Enose-Akahata *et al.*, 2012). O papel das células T CD8⁺ é bem estudado na infecção pelo HTLV-1. Por exemplo, é observada uma alta frequência de células T CD8⁺ no sangue periférico e no líquido cefalorraquidiano, e este fato está associado ao desenvolvimento da HAM/TSP (Nagai *et al.*, 2001). Enose-Akahata e cols. mostraram que a diminuição da função de fagócitos mononucleares diminui a função de células T citotóxicas em pacientes com HAM/TSP, e pode interferir no desenvolvimento das manifestações clínicas observadas na infecção pelo HTLV-1 (Enose-Akahata *et al.*, 2012). Mais uma vez, destaca-se a importância do estudo das células da imunidade inata na infecção pelo HTLV-1.

O HTLV-1 também é responsável por suprimir a resposta imune a outros antígenos e aumentar a susceptibilidade e gravidade de infecções causadas por outros patógenos, como *M. tuberculosis* (Pedral-Sampaio *et al.*, 1997; Marinho *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2009 e 2012), bactérias orais (Martins *et al.*, 2010) e dermatotrópicas (LaGrenade *et al.*, 1990), vírus C da hepatite (Kishihara *et al.*, 2001), *Schistosoma mansoni* (Porto *et al.*, 2004) e *Strongyloides stercoralis* (Porto *et al.*, 2001). Por exemplo, na resposta contra o *S. stercoralis* a produção de citocinas do tipo Th2 e a produção de anticorpos IgE são essenciais no combate ao parasita. Porém na co-infecção com o HTLV-1 essa resposta tende a diminuir, levando a maior disseminação e gravidade dos sintomas clínicos associados ao helminto (Porto *et al.*, 2001). A co-infecção entre o HTLV-1 e o *M. tuberculosis*, também está associada com o aumento da susceptibilidade e gravidade à tuberculose. A frequência de indivíduos respondedores ao teste tuberculínico e a proliferação espontânea de linfócitos estimulados com PPD é menor entre os indivíduos co-infectados com *M. tuberculosis* do que indivíduos não infectados pelo vírus (Murai *et al.*, 1990; Tachibana *et al.*, 1988; Welles *et al.*, 1994; Mascarenhas *et al.*, 2006). Além disso, a produção de TNF- α por células mononucleares estimuladas com PPD de indivíduos co-infectados pelo HTLV-1 e *M. tuberculosis* foi menor do que o encontrado em indivíduos infectados apenas pelo *M. tuberculosis* (Bastos *et al.*, 2012). Estes resultados sugerem que a susceptibilidade à tuberculose pode estar relacionada com a diminuição na produção de TNF- α . Adicionalmente a gravidade da doença em indivíduos co-infectados pode estar associada à exacerbação da resposta Th1.

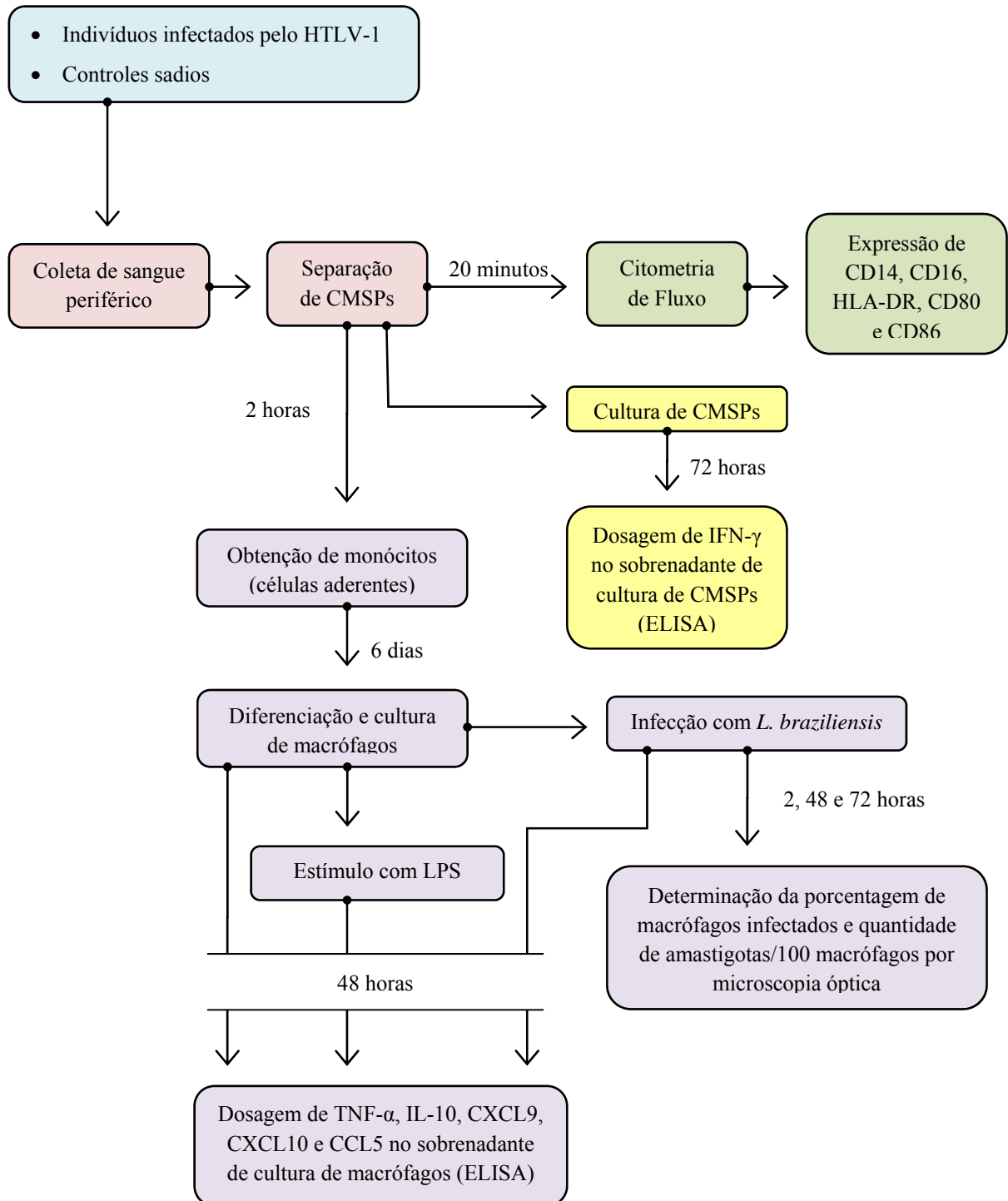
Poucos estudos têm avaliado a resposta imune inata nas co-infecções entre o HTLV-1 e outros agentes intracelulares (*Mycobacterium tuberculosis* e vírus C da hepatite,

por exemplo). Especula-se que haja um defeito nas células apresentadoras de antígenos em indivíduos infectados pelo HTLV-1, que impediria o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa adequada contra outros agentes infecciosos. Como na infecção pelo HTLV-1 uma das principais características é a superprodução de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α), com ênfase na HAM/TSP, é possível que a constante estimulação de monócitos e macrófagos interfira no grau de ativação e altere a capacidade microbicida e produção de citocinas e quimiocinas.

A despeito da infecção pelo HTLV-1 se associar com grande produção de IFN- γ , principal citocina ativadora de macrófagos, ainda não foi estudado se a capacidade destas células em fagocitar e destruir um agente infectante. Como a infecção pelo HTLV-1 se associa com maior susceptibilidade à infecção por agentes intracelulares como *M. tuberculosis* e fungos é importante que se compare a capacidade de macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com macrófagos de indivíduos saudáveis em fagocitar e destruir outro microrganismo intracelular. Um dos principais objetivos deste trabalho foi avaliar a capacidade de macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 de destruir o protozoário *Leishmania braziliensis*. A escolha da *Leishmania braziliensis* foi devido à experiência existente no laboratório em lidar com este tipo de infecção. Neste trabalho além de avaliar a função fagocítica e microbicida de macrófagos infectados pelo HTLV-1, foram determinadas as concentrações de TNF- α , IL-10, CXCL9, CXCL10 e CCL5 no sobrenadante destas células.

CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

1) DESENHO EXPERIMENTAL



2) DESENHO DE ESTUDO E POPULAÇÃO ESTUDADA

O presente trabalho é um estudo de corte-transversal com finalidade de avaliar a função de células da linhagem mielóide (monócitos e macrófagos) de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Participaram do estudo 26 indivíduos infectados pelo HTLV-1 (19 indivíduos portadores assintomáticos do vírus HTLV-1 e 7 pacientes diagnosticados com HAM/TSP), acompanhados no ambulatório multidisciplinar de HTLV-1 do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, da Universidade Federal da Bahia, Brasil. Foram excluídos indivíduos co-infectados com outros agentes patogênicos, mulheres grávidas e indivíduos em uso de drogas imunomoduladoras. O diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 foi realizado pela documentação de anticorpos anti-HTLV-1 pelo método imunoenzimático ELISA (Murex HTLV-I+II, Abbot, Dartford, UK) e a confirmação feita pelo método Western Blot (HTLV blot 2.4, Genelabs. Singapore). A disfunção motora e o grau de comprometimento neurológico foram analisada pelo Osame's motor disability score (OMDS) (Izumo *et al.*, 1996) e pela Expanded disability status scale (EDSS) (Kurtzke, 1983). Pacientes com OMDS = 0 e EDSS = 0 foram considerados portadores do HTLV-1. Pacientes com OMDS ≥ 1 e produção de anticorpos contra HTLV-1 no líquido têm diagnóstico de HAM/TSP. 19 Indivíduos sadios não infectados pelo HTLV-1 constituíram o grupo controle. O Comitê de Ética da Maternidade Climério de Oliveira da Universidade Federal da Bahia aprovou esse estudo e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Processo Nº 035/2013).

3) EXTRAÇÃO DE DNA E CARGA PROVIRAL DO HTLV-1

O DNA foi extraído de 10^6 células utilizando proteinase K pelo método de “*salting-out*”. A carga proviral do HTLV-1 foi quantificada utilizando o método de PCR em tempo real TaqMan (Dehee *et al.*, 2002). O DNA da albumina foi quantificado e utilizado como controle endógeno. A amplificação e aquisição dos dados foram realizadas utilizando o sistema de detecção de sequências ABI Prism 7700 (Applied Biosystems). A curva padrão foi gerada utilizando 5 pontos de diluição do plasmídeo (pcHTLV-ALB). Todas as diluições do padrão e das amostras dos indivíduos foram analisadas em duplicata, tanto para a quantificação do HTLV-1 como da albumina. A carga proviral foi calculada como a razão

entre (média do número de cópias do DNA de HTLV-1/média do número de cópias do DNA da albumina) x 2×10^6 e expresso como o número de cópias/ 10^6 céls.

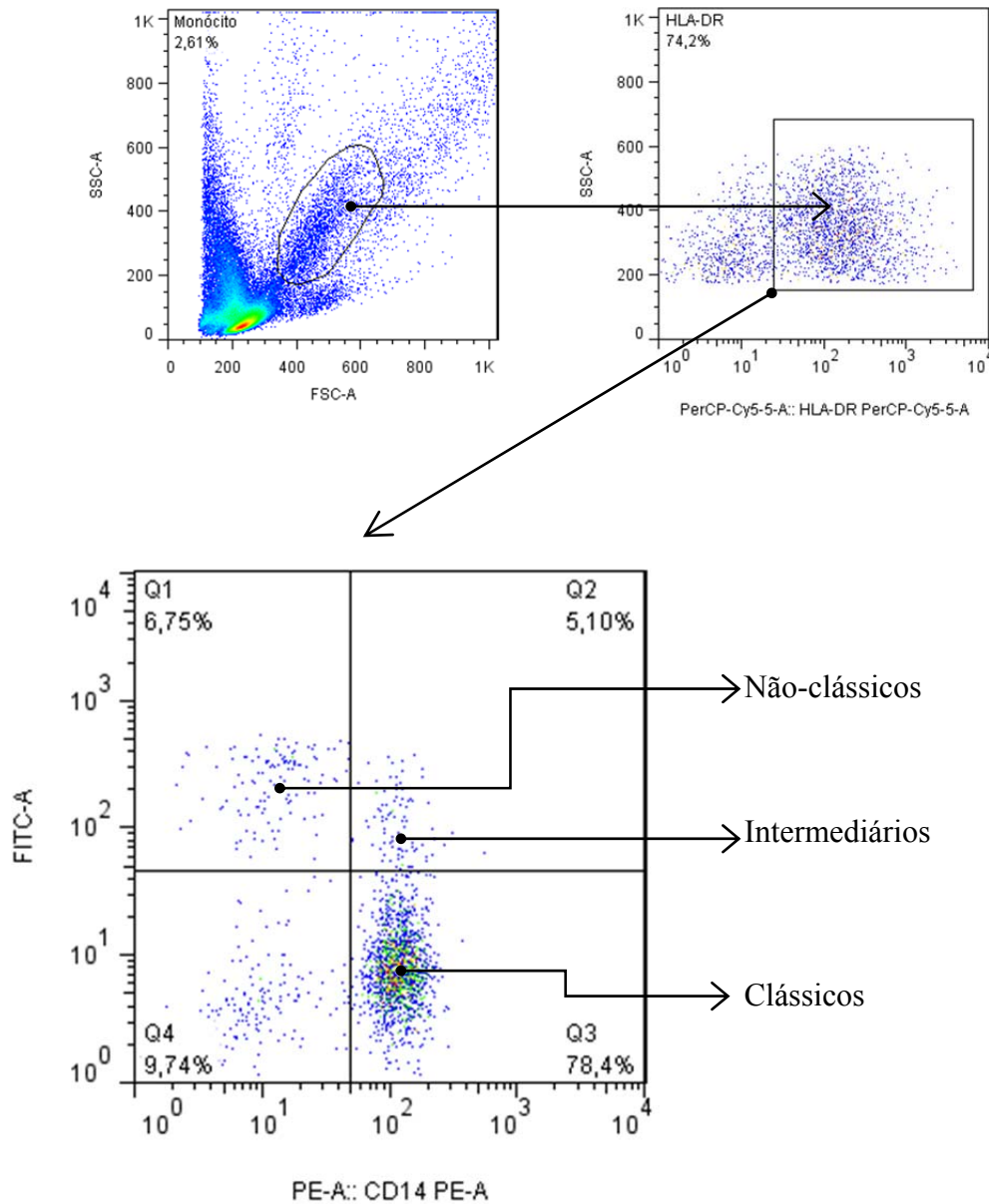
4) OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

As células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) foram obtidas a partir do sangue heparinizado dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 e dos controles saudáveis, e separadas por gradiente de densidade, com Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden), numa proporção de 3 mL para cada 10 mL de sangue e centrifugação (400 g) por 30 minutos. O anel de células mononucleares foi aspirado da interface e as células, lavadas 2 vezes em salina e ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 com L-glutamina e 25 mM de HEPES (Gibco BRL, Grand Island, New York, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,5% de gentamicina 10mg/mL (Gibco Brl, Grand Island, New York, USA). Em seguida as CMSPs foram direcionadas para três experimentos distintos: *a*) estas células foram marcadas com anticorpos específicos para experimentos com monócitos por citometria de fluxo; *b*) cultivadas para determinação da produção espontânea de IFN- γ por CMSPs. Alíquotas de 3×10^6 células em 1 mL (3×10^6 células/mL) foram incubadas sem estímulo e estimuladas com PHA (5 μ g/mL) a 37°C em 5% CO₂ por 72 horas e em seguida o sobrenadante foi congelado para futura determinação de IFN- γ .; ou *c*) cultivadas para diferenciação de monócitos em macrófagos. Alíquotas de $2,5 \times 10^6$ células em 0,5 mL (5×10^6 células/mL) foram adicionadas a placas de 4 orifícios (Lab-Tek® Permax® Chamber Slide™, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) e incubadas por 2 horas a 37°C e 5% de CO₂. As células que não se aderiram às lâminas foram removidas por lavagem. As células aderentes (monócitos) se diferenciaram em macrófagos após 6 dias de cultura a 37°C em 5% CO₂.

5) FREQUENCIA DE SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS E EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATORIAS DE SUPERFÍCIE CELULAR

A avaliação *ex-vivo* da frequência de subpopulações de monócitos e expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 foi realizada utilizando células mononucleares dos pacientes infectados pelo HTLV-1 (n=13) e dos controles sadios (n=12) marcadas com anticorpos monoclonais (anti-CD14-FITC, anti-CD16-PE-Cy5, anti-HLA-DR-PE, anti-CD80-PE e anti-CD86-PE, da eBioscience, San Diego, CA ou R&D Systems, Minneapolis, MN) por 20 minutos à 4°C. As células foram lavadas com PBS e, em seguida, fixadas com paraformaldeído a 2%. Após este período as células foram então analisadas em citômetro de fluxo (FacsCanto II, BD Biosciences, San Jose, CA) sendo a análise feita no software FlowJo versão 7.6 (TreeStar, Ashland, OR). A população de monócitos foi selecionada a partir do tamanho (FSC) e granulosidade celular (SSC), além da expressão positiva para HLA-DR, e então subdivididas em monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺CD16⁺) e não-clássicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (Figura 5). Para calcular apenas a porcentagem de monócitos clássicos, intermediários e não clássicos, excluindo as células negativamente marcadas para CD14 e CD16, foi realizada a soma das frequências das três subpopulações e o resultado considerado como 100% de monócitos. Os resultados da expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 são representados como média de intensidade de fluorescência (MIF).

Figura 5. Esquema representativo da seleção de monócitos e suas subpopulações. Os monócitos foram selecionados por citometria de fluxo a partir do tamanho (FSC) e granulidade celular (SSC), e expressão positiva para HLA-DR, e então subdivididos em monócitos clássicos ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermediários ($CD14^{+}CD16^{+}$) e não-clássicos ($CD14^{+}CD16^{++}$) a partir da co-expressão de CD14 e CD16.



6) CULTIVO E PREPARAÇÃO DA *Leishmania braziliensis*

A cepa de *L. braziliensis* LTCP 15334 isolada de um paciente com leishmaniose cutânea proveniente da área endêmica de Corte de Pedra, Salvador, Bahia, vem sendo mantida criopreservada no Serviço de Imunologia. Os parasitos foram inicialmente cultivados em tubos com meio bifásico (NNN), suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidos em cultura em meio Schneider (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina, streptomomicina e glutamina (Gibco Brl, Grand Island, New York, USA), para expansão e proliferação dos protozoários.

7) INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS COM *Leishmania braziliensis*

Para realizar a infecção as promastigotas da *L. braziliensis* foram mantidas em meio Schneider até atingir a fase estacionária ou infectiva. Em seguida, os parasitos foram centrifugadas e ressuspensas em meio RPMI 1640 e usadas para infectar macrófagos de indivíduos infectados e controles não infectados pelo HTLV-1. Macrófagos não estimulados e estimulados com LPS (100 ng/mL) foram utilizados como controles. O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina proveniente de bactérias gram-negativas, utilizado amplamente como estimulante de macrófagos. A infecção com *Leishmania braziliensis* foi realizada na proporção de 5 parasitas para cada 1 macrófago (5:1) por 2 horas a 35°C em 5% de CO₂. Os parasitos que se mantiveram fora das células após o período de incubação de 2 horas foram retirados por lavagem, e em seguida as células foram incubadas a 37°C a 5% CO₂.

8) CONTAGEM DE *L. braziliensis* PARA DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE MACRÓFAGOS INFECTADOS E QUANTIDADE DE AMASTIGOTAS INTRACELULARES

A percentagem de macrófagos infectados pela *Leishmania braziliensis* e o número de formas amastigotas deste protozoário em 100 macrófagos foram avaliados por microscopia

óptica nos tempos de 2, 48 e 72 horas, após a coloração com Giemsa. As contagens foram realizadas por dois observadores independentes que não tinham conhecimento se a lâmina era de um paciente infectado pelo HTLV-1 ou de um indivíduo controle. O resultado final corresponde à média dos resultados de ambos observadores. Os sobrenadantes das culturas destas células (sem estímulo, estimulados pelo LPS e infectados pela *L. braziliensis*) foram coletados e congelados à -20°C até serem utilizados para na determinação da concentração de citocinas e quimiocinas.

9) DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS

A concentração de IFN- γ foi determinada no sobrenadante de cultura de CMSPs após 72 horas de incubação, e as concentrações de TNF- α , CXCL9, CXCL10, CCL5 e IL-10 foram determinadas no sobrenadante de cultura de macrófagos após 48 horas de incubação, pela técnica imunoenzimática de ELISA sanduíche, utilizando kits comerciais e seguindo as recomendações dos fabricantes (DuoSet R&D Systems, Minneapolis, MN, USA e BD Pharmigen, San Diego, CA, USA). Devido à quantidade limitada de células os experimentos não foram realizados com todos os pacientes.

10) ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste U não-paramétrico Mann-Whitney foi utilizado para verificar diferenças entre os dois grupos sob mesmas condições. O teste exato de Fisher foi utilizado na análise de gênero entre os grupos. O teste T de Wilcoxon foi utilizado para avaliar a influência dos estímulos (LPS e infecção por *L. braziliensis*) quando comparadas à condição sem estímulo (meio). O teste de correlação de Spearman foi utilizado nas correlações entre as concentrações de citocinas, quimiocinas e carga proviral. Os resultados foram expressos por mediana e variação (valores mínimos e máximos). O $P < 0,05$ foi considerado resultado estatisticamente significativo.

RESULTADOS GERAIS

1) CASUÍSTICA

A Tabela 1 apresenta os dados de idade e gênero de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.

Tabela 1. Idade e gênero dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.

	Indivíduos infectados pelo HTLV-1 (n = 26)	Controles Sadios (n = 19)	Valor de P
Idade, anos (máx.-mín.)	49 (21-71)	28 (23-43)	<0,0001*
Gênero (F/Total - % F)	21/26 (81%)	9/19 (47%)	0,02**

* = teste não paramétrico de Mann-Whitney; ** = teste exato de Fisher.

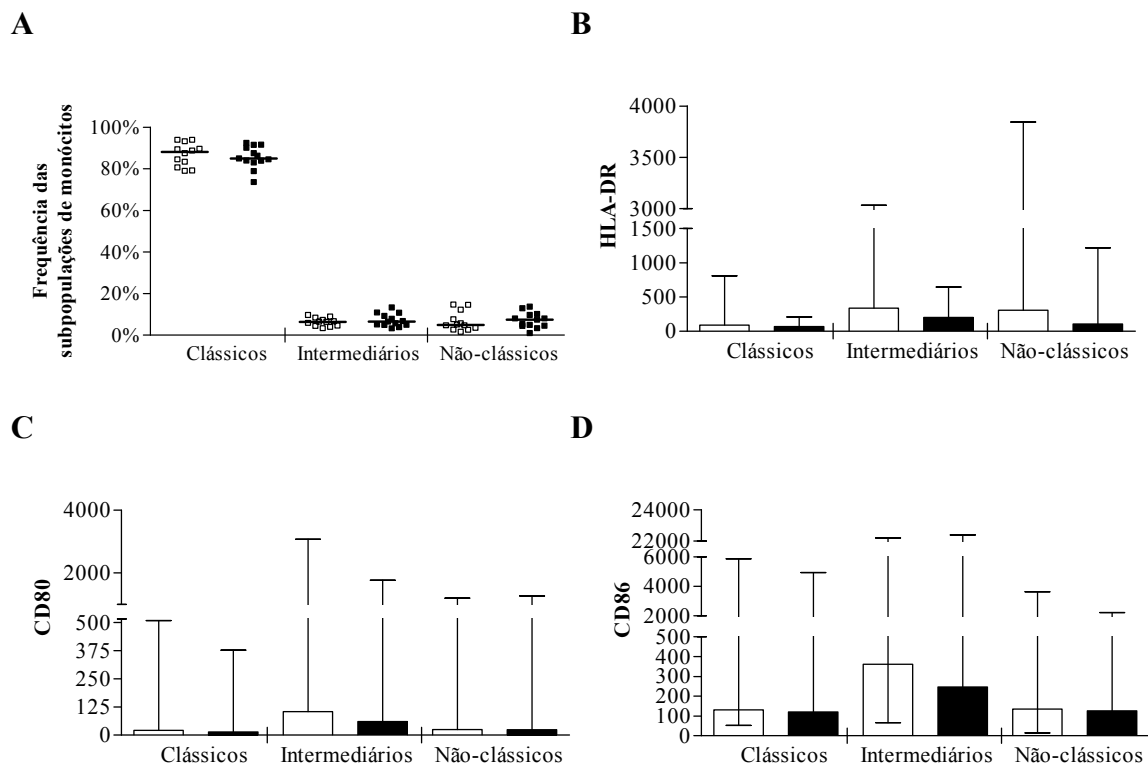
Participaram do estudo 26 indivíduos infectados pelo HTLV-1 recrutados de uma coorte acompanhada no Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-1. Indivíduos não infectados pelo HTLV-1 (n = 19) constituíram o grupo de controles sadios. Os indivíduos infectados pelo HTLV-1 tinham idade entre 21 a 71 anos (mediana de 49 anos), enquanto no grupo de controles sadios as idades variavam de 23 a 43 anos (mediana de 28 anos). Os indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentaram idade mais elevada do que controles sadios ($P < 0,0001$).

Em relação ao gênero, aproximadamente 81% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 eram do gênero feminino (21/26), enquanto no grupo de controles sadios essa porcentagem correspondeu a 47% (9/19). O grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentou maior número de indivíduos do gênero feminino do que o grupo de controles sadios ($P = 0,02$).

2) FREQUENCIA DE SUBPOPULAÇÕES DE MONÓCITOS E EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS CO-ESTIMULATÓRIAS DE SUPERFÍCIE CELULAR

As frequências das subpopulações de monócitos e a expressão *ex vivo* de moléculas co-estimulatórias (HLA-DR, CD80 e CD86) nestas células foram determinadas através de ensaio por citometria de fluxo e são mostradas na Figura 6.

Figura 6. Frequência das subpopulações de monócitos (clássico, intermediários e não-clássicos) e expressão de HLA-DR, CD80 e CD86 em monócitos de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.



Em **A**, é representada a frequência de subpopulações de monócitos em indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 ($n = 13$, ■) e controles sadios ($n = 12$, □) e em **B**, **C** e **D** são representadas as medianas da intensidade de fluorescência de HLA-DR, CD80 e CD86 nestas mesmas células, respectivamente. Ensaio realizado por citometria de fluxo. As subpopulações de monócitos avaliadas foram: clássicos ($CD14^{++}CD16^{-}$), intermediários ($CD14^{+}CD16^{+}$) e não-clássicos ($CD14^{+}CD16^{++}$). Resultados expressos pela mediana e variação (valores mínimos e máximos). Teste U não-paramétrico de Mann-Whitney ($*P < 0,05$) foi utilizado na análise estatística.

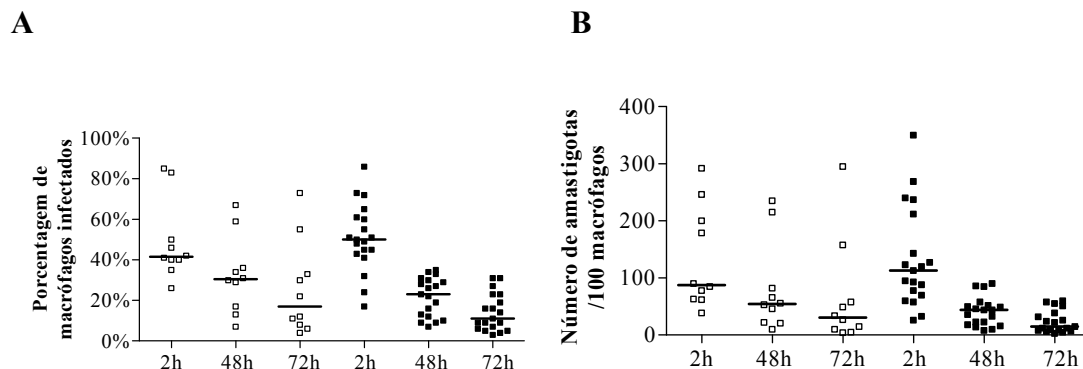
Indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 apresentaram 87,5% de monócitos clássicos, 6,45% de monócitos intermediários e 4,9% de monócitos não-clássicos, enquanto controles sadios apresentaram 85% de monócitos clássicos, 6,5% de monócitos intermediários e 7,5% de monócitos não-clássicos. O grupo de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 apresentou frequências das subpopulações de monócitos semelhantes às encontradas no grupo de controles sadios ($P > 0,05$) (Figura 6A).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre a média de intensidade de imunofluorescência de moléculas co-estimulatórias quando comparada nos dois grupos. A mediana e variância da intensidade de imunofluorescência de HLA-DR em monócitos clássicos de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios foram respectivamente 80 (41 – 208) e 90 (27 – 811). Com relação aos monócitos intermediários a mediana e variância foram 210 (48 – 646) no grupo de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 e 330 (40 – 3,033) no grupo de controles sadios. Em relação aos monócitos não-clássicos, a mediana e variância foram 100 (17 – 1,217) no grupo de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 e 300 (16 – 3,845) no grupo de controles sadios (Figura 6B). A mediana e variância da intensidade de imunofluorescência de CD80 em monócitos clássicos de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios foram respectivamente 10 (5 – 377) e 13 (4 – 509). Em relação aos monócitos intermediários a mediana e variância foram 53 (12 – 1,769) no grupo de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 e 103 (30 – 3,075) no grupo de controles sadios. Com relação aos monócitos não-clássicos, a mediana e variância foram 20 (3 – 1,273) no grupo de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 e 20 (3 – 1,200) no grupo de controles sadios (Figura 6C). A mediana e variância da intensidade de imunofluorescência de CD86 em monócitos clássicos de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios foram 138 (52 – 4,937) e 91 (52 – 5,875). Com relação aos monócitos intermediários a mediana e variância foram 230 (158 – 22,400) no grupo de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 e 344 (67 – 22,200) no grupo de controles sadios. Em relação aos monócitos não-clássicos, a mediana e variância foram 138 (49 – 2,235) no grupo de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 e 91 (15 – 3,632) no grupo de controles sadios (Figura 6D).

3) AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MICROBICIDA DE MACRÓFAGOS APÓS INFEÇÃO COM *Leishmania braziliensis*.

Para avaliar a susceptibilidade dos macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 serem infectados por um agente intracelular e a capacidade que estas células têm de eliminá-lo, os macrófagos foram infectados por *L. braziliensis* e a porcentagem de células infectadas por *L. braziliensis* e a quantidade de formas amastigotas deste protozoário em 100 macrófagos foram determinadas pela microscopia óptica (Figura 7). Estas contagens foram realizadas 2, 48 e 72 horas após a infecção por *L. braziliensis*.

Figura 7. Porcentagem de macrófagos infectados por *L. braziliensis* e número de amastigotas intracelulares.



Macrófagos foram infectados por *L. braziliensis* em fase estacionária numa razão de 5:1. A porcentagem de macrófagos infectados (**A**) e o número de formas amastigotas intracelulares (**B**) foram avaliados 2, 48 e 72 horas após infecção. Controles saudáveis ($n = 10$, □), indivíduos infectados pelo HTLV-1 (assintomáticos e com HAM/TSP) ($n = 19$, ■). Os resultados são representados pela mediana. Teste U não-paramétrico de Mann-Whitney ($*P < 0,05$) foi utilizado na análise estatística.

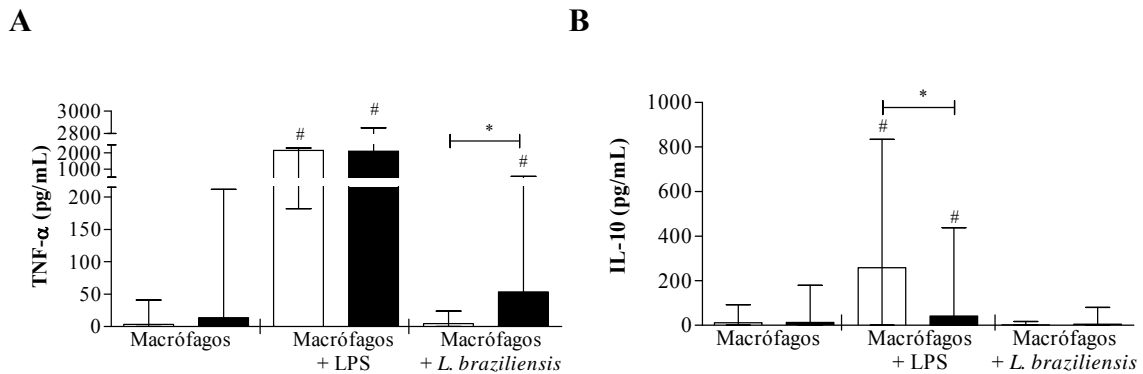
Após 2 horas de infecção pela *L. braziliensis*, 41% dos macrófagos de controles sadios estavam infectados (variando de 26% a 85%), enquanto 50% estavam infectados no grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (variando de 17% a 86%). Após 48 horas de infecção, observou-se 30% de macrófagos infectados no grupo de controles sadios (variando de 7% a 67%) e 23% no grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (variando de 7% a 35%). Após 72 horas, as porcentagens foram de 17% no grupo de controles sadios (variando de 4% a 73%) e 11% no grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (variando de 3% a 31%). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a capacidade microbicida de macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e de controles sadios após 2, 48 e 72 horas de infecção por *L. braziliensis* (Figura 7A).

Ao avaliar a quantidade de formas amastigotas de *L. braziliensis* encontradas em 100 macrófagos, após 2 horas de infecção, em torno de 120 leishmanias foram encontradas dentro de 100 macrófagos de controles sadios (variando de 39 a 292 leishmanias), e no grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram 113 leishmanias (variando de 26 a 350 leishmanias). Após 48 horas de infecção foram encontradas 50 leishmanias no interior de 100 macrófagos de controles sadios (variando de 10 a 235 leishmanias), enquanto no grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram 44 leishmanias (variando de 8 a 90 leishmanias). Após 72 horas de infecção, foram encontradas 30 leishmanias no grupo de controles sadios (variando de 4 a 295) e 15 leishmanias no grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (variando de 3 a 60 leishmanias). Também não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de amastigotas em 100 macrófagos no grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios, após 2, 48 e 72 horas de infecção por *L. braziliensis* (Figura 7B).

4) PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PRODUZIDAS POR MACRÓFAGOS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1

As concentrações de TNF- α e IL-10 foram determinadas no sobrenadante de cultura de macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (assintomáticos e com HAM/TSP) após 48 horas de cultura, pela técnica de ELISA, e são mostradas na Figura 8.

Figura 8. Concentrações de TNF- α e IL-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos.



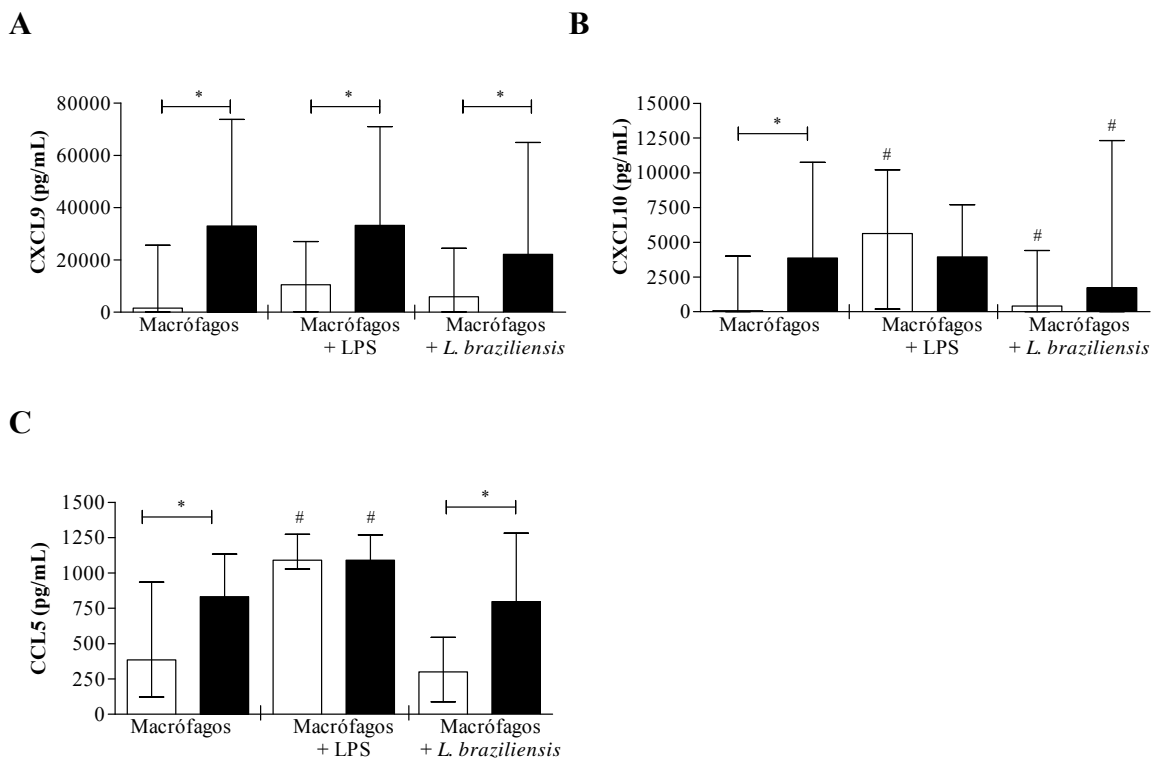
Macrófagos de controles sadios ($n = 10$, □) e indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram cultivados sem estímulo, com LPS ou *L. braziliensis* (razão de 5:1) por 48 horas para avaliar a produção de TNF- α (A, indivíduos infectados pelo HTLV-1 $n = 26$, ■) e IL-10 (B, indivíduos infectados pelo HTLV-1 $n = 14$, ■). As concentrações destas citocinas foram determinadas por ELISA. Os resultados são representados pela mediana e pela variação (valores mínimos e máximos). Teste U não-paramétrico de Mann-Whitney ($*P < 0,05$) e o teste T de Wilcoxon ($\#P < 0,05$), foram utilizados na análise estatística.

Macrófagos de controles sadios, assim como macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1, não produziram espontaneamente concentrações detectáveis significativas de TNF- α (3 pg/mL vs 13 pg/mL, respectivamente). Quando os macrófagos dos dois grupos estudados foram estimulados com LPS, concentrações elevadas de TNF- α foram detectadas. Macrófagos de controles sadios produziram 2,160 pg/mL, e macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produziram 2,112 pg/mL, mas não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre estas concentrações. Após a infecção pela *L. braziliensis*, apenas os macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram capazes de aumentar a produção de TNF- α quando comparada à produção espontânea desta citocina (a concentração de TNF- α passou de 13 pg/mL para 53 pg/mL, $P = 0,01$), enquanto no grupo de controles sadios a produção foi de 4,5 pg/mL. Adicionalmente, macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produziram mais TNF- α após infecção pela *L. braziliensis*, do que macrófagos de controles sadios ($P = 0,003$) (Figura 8A).

Macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e de controles sadios não foram capazes de produzir IL-10 em concentrações significantes tanto espontaneamente (12 pg/mL vs 11 pg/mL respectivamente), quanto quando foram infectados pela *L. braziliensis* (0 pg/mL em ambos os grupos). Porém quando os macrófagos foram estimulados com LPS, ambos os grupos apresentaram um pequeno aumento na produção de IL-10, porém os macrófagos de controles sadios produziram mais esta citocina do que macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (258 pg/mL vs 41 pg/mL respectivamente, $P = 0,02$) (Figura 8B).

As concentrações de CXCL9, CXCL10 e CCL5 foram determinadas no sobrenadante de cultura de macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (assintomáticos e com HAM/TSP) após 48 horas de cultura, pela técnica de ELISA, e são mostradas na Figura 9.

Figura 9. Concentrações de CXCL9, CXCL10 e CCL5 no sobrenadante de cultura de macrófagos.



Macrófagos de controles saudáveis ($n = 10$, □) e indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram cultivados sem estímulo, com LPS ou *L. braziliensis* (razão de 5:1) por 48 horas para avaliar a produção de CXCL9 (A, indivíduos infectados pelo HTLV-1 $n = 25$, ■), CXCL10 (B, indivíduos infectados pelo HTLV-1 $n = 17$, ■) e CCL5 (C, indivíduos infectados pelo HTLV-1 $n = 16$, ■). As concentrações destas quimiocinas foram determinadas por ELISA. Os resultados são representados pela mediana e pela variação (valores mínimos e máximos). Teste U não-paramétrico de Mann-Whitney ($*P < 0,05$) e o teste T de Wilcoxon ($\#P < 0,05$), foram utilizados na análise estatística.

Macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produziram espontaneamente concentrações mais elevadas de CXCL9 do que macrófagos de controles sadios (32,992 pg/mL vs 1,573 pg/mL, $P = 0,0009$). Macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 também produziram mais CXCL9 do que macrófagos de controles sadios após estímulo com LPS (33,253 pg/mL vs 10,524 pg/mL, $P = 0,0007$) ou após infecção por *L. braziliensis* (22,114 pg/mL vs 5,991 pg/mL, $P = 0,006$) (Figura 9A).

Assim como a produção de CXCL9, macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produzem concentrações mais elevadas de CXCL10 espontaneamente do que macrófagos de controles sadios (3,865 pg/mL vs 86 pg/mL, $P = 0,004$), contudo a adição de LPS à cultura estimulou os macrófagos de controles sadios a produzirem CXCL10 (passando da produção espontânea de 86 pg/mL para 5,627 pg/mL, $P = 0,002$), enquanto no grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 a produção de CXCL10 continuou semelhante após o estímulo (passando de 3,865 pg/mL para 3,938 pg/mL). Não houve diferença estatisticamente significativa na produção de CXCL10 por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e de controles sadios quando estimulados pelo LPS. Quando os macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram infectados pela *L. braziliensis*, a produção de CXCL10 diminuiu de 3,865 pg/mL para 1,725 pg/mL ($P = 0,01$), enquanto o aumento da concentração desta citocina foi observado no grupo de controles sadios (passando de 86 pg/mL para 422 pg/mL, $P = 0,03$). Não houve diferença estatisticamente significativa na produção de CXCL10 por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e de controles sadios quando infectados pela *L. braziliensis* (Figura 9B).

Macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produziram espontaneamente mais CCL5 do que macrófagos de controles sadios (832 pg/mL vs 383 pg/mL respectivamente, $P = 0,006$). Quando os macrófagos foram estimulados pelo LPS, ambos os grupos produziram concentrações iguais de CCL5 (1,090 pg/mL no grupo de controles sadios vs 1,090 pg/mL no grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1). Ao infectar os macrófagos com *L. braziliensis*, os macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produziram mais CCL5 do que macrófagos de controles sadios (797 pg/mL vs 300 pg/mL respectivamente, $P = 0,0009$) (Figura 9C).

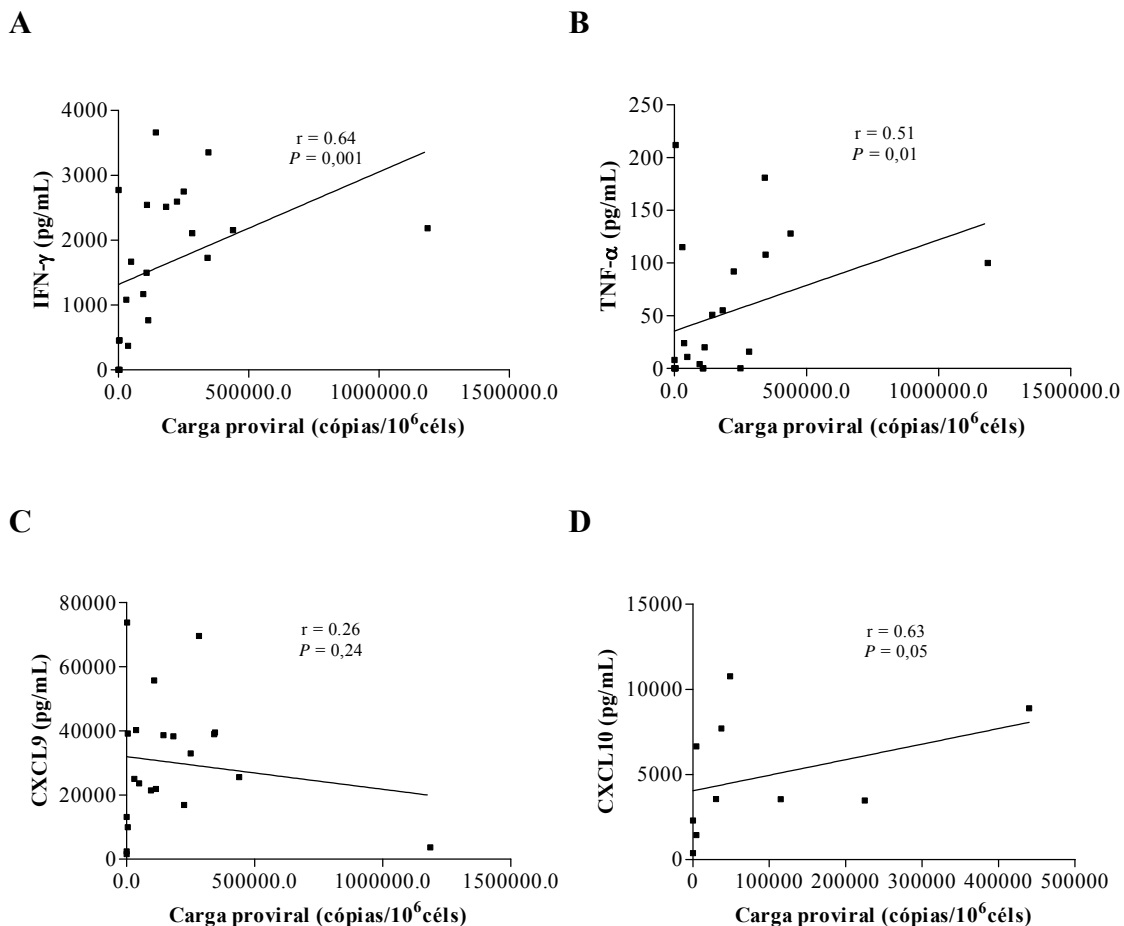
5) CORRELAÇÃO ENTRE A PRODUÇÃO DE IFN- γ POR CMSPs E CITOCINAS E QUIMIOCIAS PRODUZIDAS POR MACRÓFAGOS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1

Para avaliar se a produção de IFN- γ por CMSPs estava associada com a produção de TNF- α , IL-10, CXCL9, CXCL10 e CCL5, foram avaliadas correlações utilizando o teste de correlação de Spearman. Não foi encontrada nenhuma correlação entre a produção de IFN- γ produzida por CMSPs e as concentrações destas citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (dados não apresentados).

6) CORRELAÇÃO ENTRE A CARGA PROVIRAL E A PRODUÇÃO CITOCINAS E QUIMIOCIAS POR CMSPs E MACRÓFAGOS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1

As correlações entre a carga proviral e a produção de IFN- γ por CMSPs, TNF- α , CXCL9 e CXCL10 por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram avaliadas utilizando o teste de correlação de Spearman, e são mostradas na Figura 10.

Figura 10. Correlação entre a carga proviral e a produção de IFN- γ , TNF- α , CXCL9 e CXCL10 por células de indivíduos infectados pelo HTLV-1.



Correlação entre a carga proviral de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e a produção de (A) IFN- γ produzidas por CMSPs (n = 22), (B) TNF- α (n = 22), (C) CXCL9 (n = 21) e (D) CXCL10 (n = 10) produzidas por macrófagos. O teste de correlação de Spearman foi utilizado na análise estatística ($P < 0,05$).

Foi observada uma correlação positiva entre a carga proviral e a produção de IFN- γ por CMSPs ($r = 0,64$ e $P = 0,001$), e entre a carga proviral e a produção de TNF- α ($r = 0,51$ e $P = 0,01$) e CXCL10 ($r = 0,63$ e $P = 0,05$) produzidas por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Não foi encontrada correlação entre a carga proviral e a produção de CXCL9 por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

DISCUSSÃO

A resposta imune adaptativa tem sido bastante estudada na infecção pelo HTLV-1. Esta é caracterizada pelo aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (como por exemplo, TNF- α e IFN- γ), aumento da produção de IL-2, citocina que têm como principal função induzir a expressão de receptores envolvidos no crescimento e proliferação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Santos *et al.*, 2004; Itoyama *et al.*, 1988). Porém pouco se sabe a respeito da resposta imune inata nesta infecção. É verdade que é bem conhecida a existência de produção elevada de quimiocinas como CXCL9, CXCL10, GMC-SF, IL-1, IL-6 que são produzidas predominantemente por macrófagos, mas estudos funcionais das células da resposta imune inata na infecção pelo HTLV-1 são bastante limitados. No presente trabalho foi documentado que a frequência das subpopulações de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos foi semelhante entre indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 e o grupo controle, e que a capacidade microbicida de macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 é semelhante á observada com macrófagos de controles sadios. Também foi observado que macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produzem espontaneamente, ou com estímulo, concentrações mais elevadas de TNF- α , CXCL9, CXCL10 e CCL5, e menores concentrações de IL-10 do que macrófagos de controles sadios.

Indivíduos infectados pelo HTLV-1 possuem uma maior susceptibilidade á infecção por outros agentes infecciosos, a exemplo do *Strongyloides stercoralis* (Porto *et al.*, 2001), *Schistosoma mansoni* (Porto *et al.*, 2004) e *Mycobacterium tuberculosis* (Pedral-Sampaio *et al.*, 1997; Marinho *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2009 e 2012). Adicionalmente a infecção pelo HTLV-1 também interfere nas formas clínicas de outras doenças infecciosas piorando o quadro clínico destes indivíduos e se associando com maior mortalidade. A infecção pelo HTLV-1 aumenta a susceptibilidade e gravidade da estrogiloidíase levando á diminuição dos mecanismos de defesa contra o *Strongyloides stercoralis*. Neste caso, a elevada ativação da resposta imune Th1 característica da infecção pelo HTLV-1, diminuí a resposta imune Th2, voltada para o helminto, resultando na diminuição da produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IgE (Carvalho & Porto, 2004). Indivíduos infectados pelo HTLV-1 têm de 2 a 4 vezes mais risco de desenvolver tuberculose (Marinho *et al.*, 2005; Bastos *et al.*, 2009). Em uma coorte avaliando aspectos clínicos e imunológicos foi mostrado que embora manifestações clínicas e radiológicas da tuberculose tenham sido semelhantes em pacientes

com ou sem a infecção pelo HTLV-1, óbito só foi observado no grupo com tuberculose (Bastos *et al.*, 2012). Previamente um estudo retrospectivo mostrou que a mortalidade em pacientes com HTLV-1 e tuberculose foi significativamente maior que no grupo com tuberculose sem HTLV-1 (Pedral-Sampaio *et al.*, 1997). Com relação à infecção por fungos tem sido mostrado não só maior prevalência das micoses em indivíduos infectados pelo HTLV-1 como também formas mais graves de infecções causadas por fungos (Dantas *et al.*, 2013). É portanto importante avaliar se uma diminuição na capacidade microbicida de células da resposta imune inata nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 está relacionada com o aumento da susceptibilidade à outros agentes infecciosos. Adicionalmente poderia haver também uma alteração na expressão de moléculas co-estimulatórias nas células apresentadoras de antígenos resultando em uma diminuição da resposta imune adaptativa humoral e celular.

No presente trabalho foi documentado que a frequência de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos foi semelhante entre os dois grupos estudados. Além disso, monócitos de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 expressaram HLA-DR, CD80 e CD86 de maneira semelhante que monócitos de controles sadios. É conhecido que das três subpopulações de monócitos os intermediários são as principais células produtoras de citocinas pró-inflamatórias (Costa, 2012). Desde que células mononucleares do sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produzem mais citocinas pró-inflamatórias do que controles sadios (Santos *et al.*, 2004), esperava-se que houvesse uma maior frequência ou ativação de monócitos intermediários neste grupo, mas isso não foi observado. É importante destacar que este experimento foi realizado em indivíduos com a forma assintomática da infecção pelo HTLV-1. Em 2005 nosso grupo mostrou que há aumento da ativação espontânea de neutrófilos tanto em portadores assintomáticos como em pacientes com HAM/TSP quando comparada com controles sadios (Guerreiro *et al.*, 2005). Este fato não foi observado em monócitos no presente estudo.

Indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diagnóstico para HAM/TSP são maiores produtores de citocinas pró-inflamatórias do que indivíduos portadores e controles sadios, e não pode ser afastada a possibilidade que estudos que avaliem a frequência das subpopulações de monócitos em pacientes com HAM/TSP venham mostrar resultados diferentes. Estudos em andamento vêm sendo realizados no sentido de caracterizar a função de monócitos em indivíduos com HAM/TSP.

Como na infecção pelo HTLV-1 há aumento da susceptibilidade à infecção por patógenos intracelulares como *M. tuberculosis* e também por bactérias extracelulares, defeitos na atividade microbicida de fagócitos podem ser o motivo deste fato, pois estas células são responsáveis por internalizar e matar agentes patogênicos nos primeiros momentos da infecção. Todavia, alguns patógenos intracelulares sobrevivem por muito tempo no hospedeiro. No presente estudo foi avaliada a capacidade microbicida de macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1, e os dados mostraram que o número de leishmanias nos macrófagos foi semelhante nos dois grupos após duas horas de infecção indicando que a penetração e/ou fagocitose de *L. braziliensis* em macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 não diferem de indivíduos sem essa infecção viral. Desta forma, estudos futuros devem ser realizados no sentido de identificar outros mecanismos que estejam associados com aumento da susceptibilidade dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 a outros patógenos. Os neutrófilos são as primeiras células que entram em contato com patógenos, mas estudo pregresso mostrou que neutrófilos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 também matam *Leishmania amazonensis* da mesma forma que neutrófilos de indivíduos não infectados pelo vírus (Bezerra *et al.*, 2011). Neste estudo de Bezerra e cols, foi observado uma maior atividade neutrofilica e um maior *burst* respiratório em neutrófilos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 desde que o teste de NBT identificou o maior número de células positivas em indivíduos infectados pelo vírus do que não infectados.

Células dendríticas também fazem parte da linha de defesa inicial contra parasitos e podem estar relacionados com o aumento da susceptibilidade de indivíduos infectados pelo HTLV-1 à outros agentes infecciosos. Estudos que avaliem a capacidade microbicida de células dendríticas podem ajudar a esclarecer os mecanismos envolvidos nas co-infecções apresentadas por indivíduos portadores do HTLV-1.

Em relação à avaliação da função inflamatória de macrófagos derivados de monócitos, tanto macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 quanto macrófagos de controles sadios foram incapazes de produzir espontaneamente TNF- α . Contudo, a infecção pela *L. braziliensis* estimulou macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 a produzirem esta citocina, enquanto no sobrenadante de macrófagos de controles sadios esta molécula não foi detectada mesmo após a infecção por *L. braziliensis*. As células circulantes dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 estão sempre em constante estimulação de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios associados à resposta Th1, e esperava-se que os macrófagos desses indivíduos já estivessem ativados e produzissem mais citocinas pró-

inflamatórias que macrófagos de indivíduos saudáveis. Todavia não foi observada uma maior produção de TNF- α em culturas não estimuladas. Como os macrófagos já tinham sido incubados por 6 dias *in vitro* não pode ser afastada a hipótese de que o longo período de incubação tenha reduzido a produção de TNF- α . Fatores virais ou moléculas induzidas pela infecção do HTLV-1 podem contribuir para aumentar a produção de TNF- α . Na verdade houve uma correlação positiva entre carga proviral e produção de TNF- α e CXCL10 em culturas não estimuladas. Adicionalmente, não houve correlação entre produção de IFN- γ por CMSPs e a produção de citocinas e quimiocinas por macrófagos no grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Este fato indica que a maior produção de moléculas por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 não se relaciona totalmente com a produção de IFN- γ . É possível que as células de indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam maior resposta devido a apresentar maior número de sítios de ligação com este agente infectante. Sabe-se que esta espécie de leishmania interage com o TLR2, TLR4 e TLR9 expressos em macrófagos (Vieira *et al.*, 2013; Polari, 2013). Faz-se por tanto necessário que seja determinado se macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em razão dessa constante estimulação através da resposta Th1 apresentam maior expressão destes receptores.

No presente estudo também foi avaliada a produção de IL-10, uma citocina conhecida principalmente pelo seu papel modulador regulatório nas doenças infecciosas. Enquanto a infecção pela *L. braziliensis* não estimulou a produção de IL-10 nos dois grupos estudados, a produção desta citocina por macrófagos estimulados com LPS foi maior em células de indivíduos saudáveis do que nos indivíduos infectados pelo HTLV-1. Este é um dado relevante desde que é conhecido que CMSPs de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produzem mais IL-10 do que PBMCs de indivíduos saudáveis soro-negativos (Carvalho *et al.*, 2001). Como nós não detectamos maior produção de IL-10 por macrófagos infectados por *L. braziliensis* ou estimulados com LPS é possível que a principal fonte produtora de IL-10 em indivíduos infectados pelo HTLV-1 sejam as células T. Recentemente foi observado que monócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produzem mais IL-10 do que monócitos de controles saudáveis após contato com toxoide tetânico (Souza, 2012). Desta forma não pode ser afastada a possibilidade de que a diferenciação de monócitos em macrófagos em indivíduos infectados pelo HTLV-1 seja acompanhada de uma diminuição da capacidade de produção de IL-10.

Poucos estudos avaliaram a produção ou expressão de quimiocinas na infecção pelo HTLV-1. Em 1996, Baba e cols. mostraram que uma grande variedade de linhagens

celulares infectadas pelo HTLV-1 produzem CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 e CXCL10 (Baba *et al.*, 1996). Em 2005, Narikawa e cols. mostraram que a concentração de CXCL10 no líquido cefalorraquidiano de pacientes com HAM/TSP é maior do que em controles sadios (Narikawa *et al.*, 2005). Um estudo do nosso grupo em 2006 documentou concentrações elevadas de CXCL9 e CXCL10 no sobrenadante de PBMC de pacientes com HAM/TSP e que este fato estava associado com a alta produção de IFN- γ nestes indivíduos (Guerreiro *et al.*, 2006). Embora seja esperada que a principal fonte de quimiocinas sejam os macrófagos, nenhum estudo até o presente momento avaliou a produção de quimiocinas por essas células na infecção pelo HTLV-1. A CXCL9 é uma quimiocina conhecida por recrutar e auxiliar células da resposta Th1 e apresentam suas concentrações aumentadas na esclerose múltipla, uma doença que tem similaridades com HAM/TSP e de perfil inflamatório Th1 (Salmaggi *et al.*, 2002). Observamos que macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produzem espontaneamente concentrações exageradas de CXCL9 quando comparado aos macrófagos de controles sadios. Um fato interessante a se observar é que nem o LPS e nem a infecção pela *L. braziliensis* funcionaram como estimuladores da produção desta quimiocina. A CXCL9 foi originalmente conhecida como “monocina induzida por IFN- γ (MIG)”, e como na infecção pelo HTLV-1 existe uma exagerada ativação das células Th1, é possível que devido à ativação constante dos macrófagos pelo IFN- γ a capacidade de produção de CXCL9 tenha atingido seu pico máximo não havendo, portanto aumento da produção desta citocina após estimulação com LPS ou infecção com *L. braziliensis*. Contudo, como não houve correlação direta entre IFN- γ e CXCL9, é possível que outros mediadores inflamatórios pudessem estar estimulando a produção de CXCL9. Além disso, é possível também que o HTLV-1 possua a capacidade de transativar alguns genes do hospedeiro que estejam associados à produção de citocinas e quimiocinas. Mais estudos devem ser realizados no intuito de estabelecer qual fator que esteja influenciando na produção de CXCL9 por macrófagos nesta infecção.

Macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 também produziram mais CXCL10 que macrófagos de controles sadios mesmo sem estimulação. Todavia a infecção com *L. braziliensis* fez com que estes macrófagos diminuíssem a produção desta quimiocina. Estudos futuros são necessários para identificar a razão pela qual a infecção por *L. braziliensis* diminui a secreção de CXCL10 por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Adicionalmente, também foi encontrada uma correlação positiva entre carga proviral e produção espontânea de CXCL10 por macrófagos, e novamente é possível que fatores virais

ou moléculas induzidas pela infecção do HTLV-1 possam contribuir no aumento da produção de CXCL10, assim como ocorrido com a produção de TNF- α .

A CCL5 é uma quimiocina associada com a resposta imune Th2 e importante recrutador de eosinófilos, e observou-se que macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produzem espontaneamente mais esta quimiocina do que macrófagos de controles saudáveis. Embora a infecção pelo *L. braziliensis* não tenha interferido na produção desta quimiocina, a estimulação com LPS aumentou a produção desta molécula em indivíduos infectados pelo HTLV-1. De maneira interessante, pode-se observar que indivíduos infectados pelo HTLV-1 não só produzem mais citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como também mediadores associados à resposta imune do tipo Th2.

Este estudo foi o primeiro a avaliar a frequência das subpopulações de monócitos e marcadores de ativação nestas células, assim como a atividade microbicida e inflamatória de macrófagos na infecção pelo HTLV-1. Nossos dados indicam que infecção pelo HTLV-1 não altera as frequências de monócitos de indivíduos assintomáticos infectados por este vírus e que estas células apresentam o mesmo grau de ativação que monócitos de controles saudáveis. Com referência aos macrófagos foi observado que indivíduos infectados pelo HTLV-1 possuem a mesma capacidade de fagocitar e destruir um patógeno intracelular que macrófagos de controles saudáveis, porém a sua atividade pró-inflamatória é mais acentuada nestes indivíduos. No presente estudo encontrou-se uma dissociação entre a capacidade microbicida e produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Esta dissociação entre a atividade inflamatória e capacidade microbicida de macrófagos indica que enquanto a infecção viral e a produção predominantemente de citocinas Th1 mantêm uma resposta inflamatória que pode levar a patologia associada à infecção viral, esta exagerada resposta Th1 não contribui para uma maior capacidade do macrófago de destruir agentes intracelulares.

PERSPECTIVAS DE ESTUDOS FUTUROS

A resposta imune inata na infecção pelo HTLV-1 é pouco estudada pelos grupos de pesquisa em todo mundo. A grande maioria dos estudos que são publicados a respeito dessa infecção é baseada nas áreas clínicas, epidemiológicas, genéticas e na resposta imune adaptativa do hospedeiro voltada para o vírus. Torna-se de grande importância a avaliação da função e do papel de células da imunidade inata nesta infecção.

Embora as células TCD4⁺ sejam o principal alvo da infecção pelo HTLV-1, células TCD8⁺ (Manel *et al.*, 2005b), monócitos, macrófagos (Koralnik, 1992; de Revel *et al.*, 1993) e células dendríticas (Macatonia *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 2008; Merl *et al.*, 1984) são também infectadas por este vírus. No presente estudo, observamos que monócitos de indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 apresentam as mesmas frequências das subpopulações monocíticas que monócitos de controles saudáveis. Todavia foi constatado que macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produzem espontaneamente ou após estímulo mais TNF- α , CXCL9, CXCL10 do que macrófagos de controles saudáveis, além de produzirem menores concentrações de IL-10, quando comparados a controles não infectados pelo vírus. É conhecido que as células T CD4⁺ e T CD8⁺ são as principais fontes de produção de IFN- γ (Santos *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2001). Todavia não é conhecida quais as principais células produtoras de TNF- α e CXCL10, moléculas de grande importância na infecção pelo HTLV-1. CXCL10 é encontrada no sistema nervoso central em concentrações mais elevadas do que no sangue periférico (Luna, 2012) e dados recentes indicam que esta quimiocina é produzida por astrócitos podendo, portanto ter papel importante em recrutar outras células para o sistema nervoso central (Ando *et al.*, 2013). Sabe-se que células mononucleares do CMSPs produzem mais TNF- α do que CMSPs de indivíduos assintomáticos infectados pelo vírus e de controles saudáveis (Santos *et al.*, 2004). Uma das hipóteses que será testada futuramente é se monócitos são as principais fontes produtoras de TNF- α e CXCL10.

Não está esclarecido se a produção exagerada de citocinas observada na infecção pelo HTLV-1 é feita somente por células infectadas pelo vírus. É possível que o gene Tax do vírus transative genes produtores destas moléculas nas células humanas. Alternativamente é possível que em adição a infecção viral, fatores solúveis produzidos por células da linhagem mielóide ou linfócitos T ativem células não infectadas induzindo desta forma a secreção de

citocinas. É possível que a produção de quimiocinas e citocinas por monócitos e macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 seja feita predominantemente por células não infectadas pelo vírus. Como perspectiva futura, avaliaremos quais células estão infectadas por Tax, e correlacionaremos este dado com a produção de CXCL10 e TNF- α .

A produção de citocinas pró-inflamatórias por células da resposta imune inata está relacionada com ligação de TLRs com PAMPs e consequente ativação de MyD88, TRIF, NF- κ b e IRFs. Neste presente estudo, nós documentamos que macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produzem mais CXCL10 e CXCL9 do que indivíduos saudáveis mesmo na ausência de estímulos. Adicionalmente observamos que a produção de TNF- α por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 é maior do que indivíduos saudáveis quando estimulados com *L. braziliensis*. É sabido que a *L. braziliensis* interage com TLR2, TLR4 e TLR9 (Vieira *et al.*, 2013; Polari, 2013). Nós temos a hipótese de que na ausência de estímulos, células de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produzem mais citocinas porque já se encontram ativadas e que esta produção é aumentada na presença de um patógeno pelo aumento da expressão de TLRs nestas células. Testaremos estas hipóteses avaliando a expressão de TLR 2 e 4, MyD88, TRIF, NF- κ b e IRFs em células de indivíduos infectados pelo HTLV-1 antes e após exposição à *L. braziliensis*.

A exagerada produção de moléculas pró-inflamatórias em indivíduos infectados pelo HTLV-1 tem sido relacionada com manifestações clínicas associadas a esta infecção viral (Santos *et al.*, 2004). Além de uma capacidade maior de produzir essas moléculas devido à infecção viral e consequentemente transativação de genes indutores de CXCL9, CXCL10 e TNF- α é possível também que fatores solúveis como IFN- γ , TNF- α , IL-17 possam estar contribuindo para este processo de ativação celular. IL-10 e TGF- β são as principais citocinas moduladoras da resposta imune no homem. Também pretendemos avaliar se a modulação da produção de TNF- α , CXCL9 e CXCL10 por monócitos poderá ser feita pela adição de citocinas como IL-10 e TGF- β e por antagonistas de citocinas como anticorpo monoclonal anti-IFN- γ , anti-TNF- α e anti-IL-17.

Estudos futuros que deem seguimento ao presente trabalho estão sendo propostos e desenvolvidos, principalmente no intuito de adicionar conhecimento a respeito de células da resposta imune inata que possam contribuir no entendimento de como se comporta a infecção pelo HTLV-1.

SUMÁRIO DE RESULTADOS

- A exagerada resposta imune Th1 observada na infecção pelo HTLV-1 não altera a frequência das subpopulações de monócitos nem seu grau de ativação em indivíduos infectados pelo HTLV-1.
- Macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 são infectados pela *L. braziliensis* e destroem o parasita de maneira semelhante à macrófagos de indivíduos saudáveis.
- Macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produzem concentrações mais elevadas de TNF- α , CXCL9, CXCL10, CCL5 e menor concentração de IL-10 que macrófagos de controles saudáveis.
- Macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produzem concentrações elevadas de citocinas e quimiocinas mesmo na ausência de estímulos.
- A produção exacerbada de citocinas e quimiocinas por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 não se associa com a capacidade dessas células de matar um patógeno intracelular.
- A exagerada produção de quimiocinas e citocinas por macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 não se associa com a produção de IFN- γ produzida por CMSP, mas se relaciona com a carga proviral.

CONCLUSÕES

Macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 produzem maior quantidade de citocinas e quimiocinas espontaneamente ou após estímulo, além de possuir sua capacidade microbiciada preservada contra um agente intracelular. Existe uma dissociação entre a resposta inflamatória e a capacidade microbiciada de macrófagos de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

SUMMARY

EVALUATION MICROBICIDAL AND INFLAMMATORY ACTIVITY OF MYELOID CELL LINEAGE IN HTLV-1 INFECTION. The Human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) infects predominantly T cells inducing proliferation and lymphocyte activation. However HTLV-1 infected subjects are more susceptible to other intracellular infectious agents. The activation of macrophages is the primary defense mechanism against intracellular pathogens and little is known about role of the monocytes and macrophages in HTLV-1 infection. Objectives: To determine the frequency of monocytes subsets, expression of co-stimulatory molecules and evaluate the ability of macrophages from HTLV-1 infected subjects to kill an intracellular parasite and produce cytokines and chemokines. Methods: Participated in this study 26 HTLV-1 infected subjects and 19 healthy controls not infected with the virus. The frequencies of monocytes subsets, and expression of co-stimulatory molecules were performed by flow cytometry. Macrophages were infected with *L. braziliensis* or stimulated with LPS. The percentage of infected macrophages and the number of amastigotes/100 macrophages were evaluated by optic microscopy. Measurements of cytokines and chemokines were performed by ELISA from the supernatants of these cells. Results: There was no statistically significant difference between groups in the frequency of monocyte subpopulations and its activation. Macrophages from HTLV-1 infected subjects were infected with *L. braziliensis* at the same ratio than macrophages from healthy controls, and both groups had the same ability to kill this parasite. Macrophages from HTLV-1 infected subjects produced (after stimulus or not) more TNF- α , CXCL9, CXCL10 and CCL5, and less IL-10 than macrophages from healthy controls. While there was no correlation between IFN- γ and cytokine production by macrophages, there was a direct correlation between proviral load and levels of TNF- α and CXCL10. Conclusion: There is dissociation between the inflammatory response and microbicidal capacity of macrophages from HTLV-1 infected subjects and while the increased susceptibility of HTLV-1 infection suspect to intracellular pathogenesis is not due to decreasing ability of macrophages killing the severity of these diseases may be related to the exaggerated inflammatory response mediated by both macrophages and T cells.

Keywords: 1. HTLV-1; 2. Monocytes; 3. Macrophages; 4. Innate immunity response

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade T, Farias A, Dourado I, Galvão-Castro B. Changing patterns of HIV-I and HTLV-I/II seroprevalence among IDUs from different districts of Salvador: Efficiency of prevention strategies. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17:S35, 2001.

Arima N, Daitoku Y, Hidaka S, Yamamoto Y, Fujimoto K, Matsushita K, Ohtsubo H, Fukumori J, Tanaka H, Onoue K. Interleukin-2 production by primary adult T cell leukemia tumor cells is macrophage dependent. *American Journal of Hematology* 41(4):258-63, 1992.

Baba M, Imai T, Yoshida T, Yoshie O. Constitutive expression of various chemokine genes in human T-cell lines infected with human T-cell leukemia virus type 1: role of the viral transactivator Tax. *International Journal of Cancer* 28;66(1):124-9, 1996.

Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines - CXC and CC chemokines. *Advances in Immunology* 55:97-179, 1994.

Bangham CR. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *The Journal of General Virology*. 84(Pt 12): 3177-89, 2003.

Bastos ML, Osterbeuer B, Mesquita DL, Carrera CA, Albuquerque MJ, Silva L, Pereira DN, Lee R, Carvalho EM. Prevalence of HTLV-1 infection in hospitalized patients with tuberculosis. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 13(12): 1519–1523, 2009.

Bastos ML, Santos SB, Souza A, Finkmoore B, Bispo O, Barreto T, Cardoso I, Bispo I, Bastos F, Pereira D, Riley L, Carvalho EM. Influence of HTLV-1 on the clinical, microbiologic and immunologic presentation of tuberculosis. *BMC Infectious Diseases* 28;12:199, 2012.

Bezerra CA, Cardoso TM, Giudice A, Porto AF, Santos SB, Carvalho EM, Bacellar O. Evaluation of the microbicidal activity and cytokines/chemokines profile released by neutrophils from HTLV-1-infected individuals. *Scandinavian Journal of Immunology* 74(3):310-7, 2011.

Bittencourt AL, Dourado I, Filho PB, Santos M, Valadão E, Alcântara LC, Galvão-Castro B. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in northeastern Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 26:490-4, 2001.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2: 907–916, 2001.

Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieus R, Gessain A. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology* 2:30, 2005.

Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Castro-Costa CM, Murphy EL, Sabino EC, Galvão-Castro B, Alcântara LC, Remondegui C, Verdonck K, Proietti FA. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. *Revista Panamericana de Salud Pública* 19:44-53, 2006.

Carneiro-Proietti AB, Ribas JG, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GE, Martins-Filho OA, Pinheiro SR, Araújo AQ, Galvão-Castro B, de Oliveira MS, Guedes AC, Proietti FA. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 499 - 508, 2002.

Carvalho EM, Bacellar O, Porto AF, Braga S, Galvão-Castro B, Neva F. Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 27(1):1-6, 2001.

Carvalho EM, Da Fonseca Porto A. Epidemiological and clinical interaction between HTLV-1 and *Strongyloides stercoralis*. *Parasite Immunology* 26(11-12):487-97, 2004.

Caskey MF, Morgan DJ, Porto AF, Giozza SP, Muniz AL, Orge GO, Travassos MJ, Barrón Y, Carvalho EM, Glesby MJ. Clinical manifestations associated with HTLV type 1 infection: A cross-sectional study. *AIDS Research and Human Retroviruses* 23(3): 365-371, 2007.

Castro NM, Oliveira P, Freitas D, Rodrigues W, Muniz A, Carvalho EM. Erectile dysfunction and HTLV-I infection: a silent problem. *International Journal of Impotence Research*, v.17 p.364-9, 2005.

Castro NM, Rodrigues WJr, Freitas DM, Muniz A, Oliveira P, Carvalho EM. Urinary symptoms associated with human T-cell lymphotropic virus type I infection: evidence of urinary manifestations in large group of HTLV-I carriers. *Urology*, v.69 p.813-8, 2007.

Colisson R, Barblu L, Gras C, Raynaud F, Hadj-Slimane R, Pique C, Hermine O, Lepelletier Y, Herbeuval JP. Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 18;115(11):2177-85, 2010.

Costa, Rúbia Suely Santana. Contribuição das diferentes subpopulações de monócitos para a resposta inflamatória na leishmaniose cutânea. 2012. 104 f. Dissertação (*Mestrado em Ciências da Saúde*) – Serviço de Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Brasil, 2013.

Dantas L, Netto E, Glesby MJ, Carvalho EM, Machado P. Dermatological manifestations of individuals infected with human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I). *International Journal of Dermatology* doi: 10.1111/ijd.12170, 2013.

de Revel T, Mabondzo A, Gras G, Delord B, Roques P, Boussin F, Neveux Y, Bahau M, Fleury HJ, Dormont D. In vitro infection of human macrophages with human T-cell leukemia virus type 1. *Blood* 81, 1598–1606, 1993.

Dehée A, Césaire R, Désiré N, Lézin A, Bourdonné O, Béra O, Plumelle Y, Smadja D, Nicolas JC. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *Journal of Virological Methods* 102(1-2):37-51, 2002.

Dourado I, Alcântara LCJ, Barreto ML, Teixeira MG, Galvão-Castro B. HTLV-1 in general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 34:527-531, 2003.

Dourado I, Andrade T, Carpenter CL, Galvão-Castro B. Risk factors for human T cell lymphotropic virus type I among injecting drug users in northeast Brazil: possibly greater efficiency of male to female transmission. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94:13-8, 1999.

Edlich RF, Hill LG, Williams FM. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1): an update. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*, 13(2):127-40, 2003.

Eguchi K, Matsouka N, Ida N, Nakashima M, Sakai M, Sakito S, Kawakami A, Terada K, Shimada H, Kawabe Y. Primary Sjogren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.51 p.769-76, 1992.

Enose-Akahata Y, Matsuura E, Tanaka Y, Oh U, Jacobson S. Minocycline modulates antigen-specific CTL activity through inactivation of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I associated neurologic disease. *Retrovirology* 15;9:16, 2012.

Fan M, Gavalchin J, Paul B, Wells KH, Lane MJ, Poiesz BJ. Infection of peripheral blood mononuclear cells and cell lines by cell-free Human T cell Lymphoma/Leukemia virus Type I. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 905-910, 1992.

Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 5(14):1317-27, 2003.

Ferreira OC, Planelles V, Rosenblatt JD. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. *Blood Review*, 11, 91-104, 1997.

Fife BT, Paniagua MC, Lukacs NW, Kunkel SL, Karpus WJ. Selective CC chemokine receptor expression by central nervous system-infiltrating encephalitogenic T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroscience Research* 15;66(4):705-14, 2001.

Forman HJ & Torres M. Redox signaling in macrophages. *Molecular Aspects of Medicine* 22(4-5):189-216, 2001b.

Forman HJ & Torres M. Signaling by respiratory burst in macrophages. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 51(6):365-71, 2001a.

Franchini G, Streicher H. Human T-cell leukemia virus. *Baillière's Clinical Haematology* 8: 131-148, 1995.

Franchini G. Molecular mechanism of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 infection. *Blood* 86: 3619-3639, 1995.

Garlet GP, Giozza SP, Silveira EM, Claudino M, Santos SB, Avila-Campos MJ, Martins W Jr, Cardoso CR, Trombone AP, Campanelli AP, Carvalho EM, Silva JS. Association of human T lymphotropic virus 1 amplification of periodontitis severity with altered cytokine expression in response to a standard periodontopathogen infection. *Clinical Infectious Diseases* 50(3):11-8, 2010.

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

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de Thé G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2(8452):407-10, 1985.

- Giozza SP, Santos SB, Martinelli M, Porto MA, Muniz AL, Carvalho EM. Salivary and lacrimal gland disorders and HTLV-1 infection. *Revue De Stomatologie Et De Chirurgie Maxillo Faciale*; 109:153–157, 2008.
- Guerreiro JB, Porto MA, Santos SB, Lacerda L, Ho JL, Carvalho EM. Spontaneous neutrophil activation in HTLV-1 infected patients. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 9(6):510-4, 2005.
- Guerreiro JB, Santos SB, Morgan DJ, Porto AF, Muniz AL, Ho JL, Teixeira AL Jr, Teixeira MM, Carvalho EM. Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. *Clinical and Experimental Immunology* 145(2):296-301, 2006.
- Haddad R, Cilião Alves DC, Rocha-Junior MV, Azevedo R, Pombo-de-Oliveira MS, Takayanagui OM, Donadi EA, Covas DT, Kashima S. HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism is a risk factor for HTLV-1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 27(3):283-8, 2011.
- Hanon E, Hall S, Taylor GP, Saito M, Davis R, Tanaka Y, Usuku K, Osame M, Weber JN, Bangham CR. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 95(4):1386-92, 2000.
- Hishizawa M, Imada K, Kitawaki T, Ueda M, Kadowaki N, Uchiyama T. Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals. *British Journal of Haematology* 125, 568–575, 2004.
- Ho DD, Rota TR, Hirsh MS. Infection of human endothelial cells by human T-lymphotropic virus type I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 81:7588-7590, 1984.
- Inagaki S, Takahashi M, Fukunaga Y, Takahashi H. HTLV-I-infected breast milk macrophages inhibit monocyte differentiation to dendritic cells. *Viral Immunology* 25(2):106-16, 2012.
- Itoyama Y, Minato S, Kira J, Goto I, Sato H, Okochi K, Yamamoto N. Spontaneous proliferation of peripheral blood lymphocytes increased in patients with HTLV-I associated myelopathy. *Neurology* 38:1302–7, 1988.
- Izumo S, Goto I, Itoyama Y, Okajima T, Watanabe S, Kuroda Y, Araki S, Mori M, Nagataki S, Matsukura S, Akamine T, Nakagawa M, Yamamoto I, Osame M. Interferon-alpha is effective in HTLV-I-associated myelopathy: A multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. *Neurology* 46:1016–1021, 1996.
- Jain P, Manuel SL, Khan ZK, Ahuja J, Quann K, Wigdahl B. DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *Journal of Virology* 83, 10908–10921, 2009.
- Jones KS, Petrow-Sadowski C, Huang YK, Bertolette DC, Ruscetti FW. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4+ T cells. *Nature Medicine*, 14:429-36, 2008.
- Journó C, Mahieux R. HTLV-1 and innate immunity. *Viruses* 3(8):1374-94, 2011.

Kader M, Smith AP, Guiducci C, Wonderlich ER, Normolle D, Watkins SC, Barrat FJ, Barratt-Boyes SM. Blocking TLR7- and TLR9-mediated IFN- α Production by Plasmacytoid Dendritic Cells Does Not Diminish Immune Activation in Early SIV Infection. *PLoS Pathogens* 9(7):e1003530, 2012.

Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Myioshil I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 218:571-573, 1982.

Kattan T, MacNamara A, Rowan AG, Nose H, Mosley AJ, Tanaka Y, Taylor GP, Asquith B, Bangham CR. The avidity and lytic efficiency of the CTL response to HTLV-1. *Journal of Immunology* 182(9):5723-9, 2009.

Kim SJ, Kehrl JH, Burton J, Tendler CL, Jeang KT, Danielpour SD, Thevenin C, Kim KY, Sporn MB, Roberts AB. Transactivation of transforming growth factor b1 (TGF-b1) gene by human T lymphotropic virus type 1 Tax: a potential mechanism for increased production of TGF-b1 in adult T cell leukemia. *The Journal of Experimental Medicine* 172: 121-129, 1990.

Kishihara Y, Furusyo N, Kashiwagi K. Human T lymphotropic virus type 1 infection influences hepatitis C virus clearance. *The Journal of Infectious Diseases* 184: 1114-1119, 2001.

Kitagawa T, Fujishita M, Tacagushi H, Miyoshi I, Tadokoro H. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. *The Journal of American Medical Association* 256:2342, 1986.

Koralnik IJ, Lemp JF Jr, Gallo RC, Franchini G. In vitro infection of human macrophages by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). *AIDS Research and Human Retroviruses* 8(11):1845-9, 1992.

Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira J, Iwamasa T, Goto I, Yamamoto N. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* 196(1):25-33, 1993.

Kubota R, Kawanishi T, Matsubara H, Manns A, Jacobson S. Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-specific CD8⁺ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection. *The Journal of Immunology* 161: 482 - 8, 1998.

Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33:1444-1452, 1983.

LaGrenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet* 336(8727):1345-7, 1990.

Liew FY, Parkinson C, Millott S, Severn A, Carrier M. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. *Immunology* 69:570-57, 1990.

Macatonia SE, Cruickshank JK, Rudge P, Knight SC. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Research and Human Retroviruses* 8, 1699-1706, 1992.

- Macnamara A, Rowan A, Hilburn S, Kadolsky U, Fujiwara H, Suemori K, Yasukawa M, Taylor G, Bangham CR, Asquith B. HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. *PLoS Pathogens* 6(9):e1001117, 2010.
- Makino M, Wakamatsu S, Shimokubo S, Arima N, Baba M. Production of functionally deficient dendritic cells from HTLV-I-infected monocytes: implications for the dendritic cell defect in adult T cell leukemia. *Virology* 274, 140–148, 2000.
- Manel N, Battini JL, Sitbon M. Human T cell leukemia virus envelope binding and virus entry are mediated by distinct domains of glucose transporter GLUT1. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(32):29025-9, 2005a.
- Manel N, Battini JL, Taylor N, Sitbon M. HTLV-1 tropism and envelope receptor. *Oncogene*. 24(39):6016-25, 2005b.
- Marinho J, Galvão-Castro B, Rodrigues LC, Barreto ML. Increased risk of tuberculosis with human T lymphotropic virus I infection: A case-control study. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 40(5): 625–628, 2005.
- Martins FM, Casseb J, Penalva-de-Oliveira AC, de Paiva MF, Watanuki F, Ortega KL. Oral manifestations of human T-cell lymphotropic virus infection in adult patients from Brazil. *Oral Disease* 16(2):167-71, 2010.
- Mascarenhas RE, Brodskyn C, Barbosa G, Clarencio J, Andrade-Filho AS, Figueiroa F, Galvao-Castro B, Grassi F. Peripheral blood mononuclear cells from individuals infected with human T-cell lymphotropic virus type 1 have a reduced capacity to respond to recall antigens. *Clinical and Vaccine Immunology* 13:547–552, 2006.
- Merl S, Kloster B, Moore J, Hubbell C, Tomar R, Davey F, Kalinowsky D, Planas A, Ehrlich G, Clark D, Comis R, Poiesz B. Efficient transformation of previously activated and dividing T-lymphocytes by human T-cell leukemia virus. *Blood* 64:967-974, 1984.
- Mesnard JM, Barbeau B, Devaux C. HBZ, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia. *Blood* 108:3979-3982, 2006.
- Mesnard JM, Devaux C. Multiple control levels of cell proliferation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *Virology* 257: 277-284, 1999.
- Michailidis C, Giannopoulos G, Vigklis V, Armenis K, Tsakris A, Gargalianos P. Impaired phagocytosis among patients infected by the human immunodeficiency virus: implication for a role of highly active anti-retroviral therapy. *Clinical of Experimental Immunology* 167(3):499-504, 2012.
- Morgan OS, Rodgers-Johnson P, Mora C, Char G. HTLV-I and polymyositis in Jamaica. *Lancet*, v.2 p.1184-7, 1989.
- Mota AC, Van Dooren S, Fernandes FM, Pereira SA, Queiroz AT, Gallazzi VO, Vandamme AM, Galvão-Castro B, Alcantara LC. The close relationship between South African and Latin American HTLV type 1 strains corroborated in a molecular epidemiological study of the HTLV type 1 isolates from a blood donor cohort. *AIDS Research and Human Retroviruses* 23(4):503-7, 2007.

- Murai K, Tachibana N, Shioiri S, Shishime E, Okayama A, Ishizaki J, Tsuda K, Mueller N. Suppression of delayed-type hypersensitivity to PPD and PHA in elderly HTLV-I carriers. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 3:1006–1009, 1990.
- Nagai M, Usuku K, Matsumoto W, Kodama D, Takenouchi N, Moritoyo T, Hashigushi S, Ichinose M, Bangham CR, Izumo S, Osame M. 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 For Neurovirology* 4:586– 593, 1998.
- Nagai M, Yamano Y, Brennan MB, Mora CA, Jacobson S. 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* 50:807-812, 2001.
- Narikawa K, Fujihara K, Misu T, Feng J, Fujimori J, Nakashima I, Miyazawa I, Saito H, Sato S, Itoyama Y. CSF-chemokines in HTLV-I-associated myelopathy: CXCL10 up-regulation and therapeutic effect of interferon-alpha. *Journal of Neuroimmunology* 159(1-2):177-82, 2005.
- Nascimento CR, Lima MA, de Andrada Serpa MJ, Espindola O, Leite AC, Echevarria-Lima J. Monocytes from HTLV-1-infected patients are unable to fully mature into dendritic cells. *Blood* 13;117(2):489-99, 2011.
- Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological reviews* 219:88-102, 2007.
- Nowroozalizadeh S, Gudmundsdotter L, Hejdeman B, Andersson L, Esbjörnsson J, Medstrand P, Sandström E, Gaines H, Wahren B, Jansson M. Short-term HIV-1 treatment interruption is associated with dysregulated TLR-stimuli responsiveness. *Human Vaccines & immunotherapeutics* 9(10), 2013.
- Olindo S, Lezin A, Cabre P, Merle H, Saint-Vil M, Edimonana-Kaptue m, Signate A, Cesaire R, Smadja D. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: A marker of disease progression. *Journal of the Neurological Sciences* 237:53–59, 2005
- Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the Novel Proinflammatory Supergene "Interkrine" Cytokine Family. *Annual Review of Immunology* 9: 617-648, 1991.
- Osame M. Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *Journal For Neurovirology* 8: 359 – 64, 2002.
- Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74(7):2527-34, 1989.
- Pedral-Sampaio DB, Martins Netto E, Pedrosa C, Brites C, Duarte M, Harrington W Jr. Co-Infection of tuberculosis and HIV/HTLV retroviruses: frequency and prognosis among patients admitted in a Brazilian hospital. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 1(1):31-35, 1997.
- 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. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, 77:7415-7419, 1980.

Polari, Ludmila Porto Mendes. Caracterização da expressão dos receptores toll-like 2 e toll-like 4 em monócitos de pacientes com leishmaniose tegumentar. 2013. 106 f. Dissertação (*Mestrado em Imunologia*) – Serviço de Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Brasil, 2013.

Porto AF, Neva FA, Bittencourt H. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunology* 23:503–7, 2001.

Porto AF, Santos SB, Alcantara L, Guerreiro JB, Passos J, Gonzalez T, Neva F, Gonzalez D, Ho JL, Carvalho EM. HTLV-1 modifies the clinical and immunological response to schistosomiasis. *Clinical & Experimental Immunology* 137(2):424-9, 2004.

Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. *Oncogene* 24:6058-6068, 2005.

Proietti, Anna Bárbara de Freitas Carneiro. *Caderno Hemominas HTLV*. Belo Horizonte, Volume XV, pag 12-19, 2010.

Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annual Review of Immunology* 18:217-42, 2000.

Saida T, Saida K, Funauchi M, Nishiguchi E, Nakajima M, Matsuda S, Ohta M, Ohta K, Nishitani H, Hatanaka M. HTLV-I myelitis: isolation of virus, genomic analysis, and infection in neural cell cultures. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 540:636-638, 1988.

Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J, Saito K, Arimura K, Matsouka M, Ohara Y. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, in amatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology* 6:19, 2009.

Salmaggi A, Gelati M, Dufour A, Corsini E, Pagano S, Bacalini R, Ferrero E, Scabini S, Silei V, Ciusani E, De Rossi M. Expression and modulation of IFN-inducible chemokines (IP-10, Mig, and I-TAC) in human brain endothelium and astrocytes: possible relevance for the immune invasion of the central nervous system and the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 22:631–40, 2002.

Santos SB, Porto AF, Muniz AL, de Jesus AR, Magalhães E, Melo A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC Infectious Diseases* 4:7, 2004.

Sato T, Coler-Reilly A, Utsunomiya A, Araya N, Yagishita N, Ando H, Yamauchi J, Inoue E, Ueno T, Hasegawa Y, Nishioka K, Nakajima T, Jacobson S, Izumo S, Yamano Y. CSF CXCL10, CXCL9, and Neopterin as Candidate Prognostic Biomarkers for HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7(10):e2479, 2013.

Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, Matsouka M. HTLV basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(3):720-5, 2006.

Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. *British Journal of Haematology* 79:428-437, 1991.

Siqueira IS, Muniz AL, Oliveira P, Carvalho AD, Orge GO, Castro N, Bittencourt VG, Giozza SP, Porto AF, Carvalho EM. Manifestações Clínicas em pacientes infectados pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV). *Gazeta Médica da Bahia* 79:25-29, 2009.

Souza A, Tanajura D, Toledo-Cornell C, Santos S, Carvalho EM. Immunopathogenesis and neurological manifestations associated to HTLV-1 infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 45(5):545-52, 2012.

Souza, Anselmo de Santana. Diminuição da resposta imune ao toxoide tetânico em indivíduos infectados pelo HTLV-1. 2012. 105 f. *Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)* – Serviço de Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Brasil, 2012.

Svajger U, Anderluh M, Jeras M, Obermajer N. C-type lectin DC-SIGN: An adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cellular Signalling* 22, 1397–1405, 2010.

Tachibana N, Okayama A, Ishizaki J, Yokota T, Shishime E, Murai K, Shioiri S, Tsuda K, Essex M, Mueller N. Suppression of tuberculin skin reaction in healthy HTLV-I carriers from Japan. *International Journal of Cancer* 42:829–831, 1988.

Trebst C, Ransohoff RM. Investigating chemokines and chemokine receptors in patients with multiple sclerosis: opportunities and challenges. *Archives of Neurology* 58(12):1975-80, 2001.

Trinchieri G & Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *Journal of Leukocyte Biology* 59:505-511, 1996.

Tschachler E, Bohnlein E, Felzmann S, Reitz MS. Human T-lymphotropic virus type-1 Tax regulates the expression of human lymphotoxin gene. *Blood* 81: 95-100, 1993.

Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*, 50:481-492, 1977.

Vieira ÉL, Keesen TS, Machado PR, Guimarães LH, Carvalho EM, Dutra WO, Gollob KJ. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. *Parasite Immunology* 35(2):65-72, 2013.

Welles SL, Tachibana N, Okayama A, Shioiri S, Ishihara S, Murai K, Mueller NE. Decreased reactivity to PPD among HTLV-I carriers in relation to vírus and hematologic status. *International Journal of Cancer* 56:337–340, 1994.

Wolfe N, Heneine W, Carr JK, Garcia A, Shanmugam V, Tamoufe U, Torimiro J, Prosser A, Lebreton M, Mpoudi-Ngole E, Bix DL, Folks T, Burke DS, Switzer WM. Emergence of unique primate of T-lymphotropic viruses among central África bushmeat hunters. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, 102: 7994-7999, 2005.

Wycuff DR, Goff MD, Marriott SJ. Identification of an initiator-like element within the HTLV-1 promoter. *Virology* 280(1):72-9, 2001.

Yoshida M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annual Review of Immunology* 19: 475-495, 2001.

Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sozzani S, Strobl H,

Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116(16):e74-80, 2010.

Ziegler-Heitbrock L, Hofer TP. Toward a refined definition of monocyte subsets. *Frontiers in Immunology* 4:23, 2013.

ANEXOS

ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Controles

Nome do Projeto: Resposta Imunológica, Fatores Virais e Infecções por Helmintos na Expressão da Doença Associada ao HTLV-1

Investigador Principal: Edgar M. Carvalho, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brasil.

Comitê de Ética: Maternidade Clímério de Oliveira/UFBA, Rua do Limoeiro, nº 137 - Nazaré Cep.: 40.055-150 Salvador, BA, 55 71 3283-9210/9211, cepmco@ufba.br/cepmco@gmail.com

Nome do Participante: _____

Número de Identificação no Projeto: _____

Convite e Objetivo: Você é convidado a participar de um estudo que tem como objetivo avaliar as razões pelas quais alguns pacientes apresentam doença neurológica associada à infecção pelo HTLV-1. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo aos médicos que fazem parte do projeto. Antes de concordar em participar desta pesquisa é importante que você leia este documento, e caso decida participar do estudo você será solicitado (a) a assinar este formulário de consentimento.

Você foi selecionado como um possível participante nesse estudo porque você doou sangue a um banco de sangue em Salvador, Bahia e foi identificado como NÃO estando infectado pelo vírus HTLV-1.

Participação Voluntária:

A sua participação no estudo é voluntária e você estará contribuindo para o melhor entendimento da doença causada pelo vírus HTLV-1. Sua participação nesse estudo será de apenas 1 dia. Você é livre para recusar a participar no estudo, sem perder os seus direitos a cuidados médicos de rotina e sem nenhuma consequência quanto a futuros cuidados médicos no Hospital Universitário Prof. Edgard Santos.

Finalidade do Estudo: O objetivo desse estudo é entender as razões porque pessoas desenvolvem uma doença neurológica associada ao HTLV-1 e quais outros sintomas elas podem vir a desenvolver por causa dessa infecção.

Procedimentos: Caso você decida participar do estudo será solicitado que você doe trinta mililitros de sangue (mais ou menos 2 colheres de sopa) que vão ser usados para avaliar sua resposta imunológica (sua capacidade de combater infecções).

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe científica. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Análises de Riscos e Benefícios:

A retirada de sangue nos pacientes pode provocar dor leve devido à punção com agulha. Em casos raros se acompanha de sangramento ou mancha na pele. A retirada de sangue venoso é um procedimento médico de rotina, e todos os cuidados apropriados serão tomados.

Retorno de Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade: Muito pouco se sabe a respeito dos sintomas iniciais da doença neurológica associada ao HTLV-1. O objetivo do presente estudo é identificar anormalidades imunológicas associadas ao HTLV-1. O conhecimento adquirido através desse estudo poderá no futuro ajudar pessoas infectadas pelo HTLV-1, pois permitirá identificar precocemente pessoas propensas a desenvolver problemas neurológicos e neste caso poder realizar precocemente tratamento na perspectiva de evitar o desenvolvimento da doença. Desta

Claudia
Claudia Albuquerque Dias
Secretaria Administrativa
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP/MCO/UFBA

08/11/11

forma, o estudo não traz para você nenhum benefício mas ajudará os indivíduos que são infectados pelo HTLV-1.

Custos: Você não terá quaisquer custos com os exames de laboratório ou com a avaliação médica. Você não receberá nenhum pagamento por sua participação nesse estudo. Adicionalmente as suas despesas com transporte e alimentação para participar no estudo serão pagas pelo projeto.

Esclarecimentos:

Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode contatar pelo telefone 3237-7353 os pesquisadores: Dr. Edgar M. Carvalho e Dr. André Luiz Muniz, no Serviço de Imunologia do HUPES-UFBA, Rua João das Botas, s/n – Canela, telefone (071) 3237-7353, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/COM/UFBA, na pessoa do Dr. Eduardo Neto, Maternidade Clímério de Oliveira/UFBA, Rua do Limoeiro, nº 137 – Nazaré, Cep.: 40.055-150 Salvador, BA, 55 71 3283-9210/9211, cepmco@ufba.br/cepmco@gmail.com

Consentimento:

Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

- Sim, eu concordo que a amostra de sangue possa ser guardada para pesquisa no futuro.
- Não, eu não concordo que a amostra de sangue possa ser guardada para pesquisa no futuro.

_____	_____	_____
Assinatura do participante	Data	Hora
_____	_____	_____
Assinatura da testemunha	Data	Hora

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

_____	_____	_____
Assinatura do pesquisador	Data	Hora

Café 08/11/11
 Claudia Albuquerque Dias
 Secretária Administrativa
 Comitê de Ética em Pesquisa
 CEP/COM/UFBA

ANEXO 2

Ofício do Comitê de Ética em Pesquisa



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA
 MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA
 UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
 IORG0003460. Assurance FWA00002471, October 26, 2010
 IRB00004123, October 5, 2007 - October 4, 2010


Rua Augusto Viana, s/nº, Castelo – Hospital Universitário Professor Edgard Santos, 1º andar
 Cep: 40.110-160 – Salvador-Bahia telef.: (71) 3283-8043 e-mail: cepmco@ufba.br homepage: www.ceproufba.br

PARECER/RESOLUÇÃO ADITIVA N.º 35/2013

Para análise e deliberação deste Institucional o Professor, Doutor, **Edgar Marcelino de Carvalho Filho**, Pesquisador Responsável pelo Projeto de Pesquisa “Resposta imunológica, fatores virais e infecções por helmintos na expressão de doença associada ao HTLV-1”, aprovado em 30 de Abril de 2008 pelo Parecer/Resolução n.º 030/2008 deste Colegiado, apresentou, em 17 de Julho de 2013, o “Relatório Anual” das atividades desenvolvidas, bem como o pedido de prorrogação do Estudo.

Inexistindo na proposição analisada conflito administrativo, processual e ético que contrariem as disposições vigentes, fica aceito o “Relatório” além de conceder a continuidade por mais 01 (um) ano da Pesquisa, a partir desta data.

Salvador, 24 de Julho de 2013.


 Professor, Doutor, Eduardo Martins Netto,
 Coordenador – CEP/MCO/UFBA

Observações importantes. Toda a documentação anexa ao Protocolo proposto e rubricada pelo (a) Pesquisador (a), arquivada neste CEP, e também a outra devolvida com a rubrica da Secretária deste (a) ao (à) mesmo (a), faz parte intrínseca deste Parecer/Resolução e nas “Recomendações Adicionais” apenas, **bem como a impostergável entrega de relatórios parciais e final como consta nesta liberação**, (Modelo de Redação para Relatório de Pesquisa, anexo).

ANEXO 3

Manuscrito do artigo – Functional activity of monocytes and macrophages in
HTLV-1 infected subjects

Functional activity of monocytes and macrophages in HTLV-1 infected subjects

Camila F. Amorim¹, Anselmo S. Souza¹, Angela G. Diniz¹, Natália B. Carvalho¹,

Silvane B. Santos^{1,2}, Edgar M. de Carvalho^{1,*}

¹Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil.

Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Doenças Tropicais (CNPq), Salvador, Bahia, Brazil.

*Corresponding author. Edgar M. de Carvalho - Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, BA, Brazil imuno@ufba.br and edgar@ufba.br.

Abstract

The Human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) infects predominantly T cells inducing proliferation and lymphocyte activation. However HTLV-1 infected subjects are more susceptible to other intracellular infectious agents. The activation of macrophages is the primary defense mechanism against intracellular pathogens and little is known about role of the monocytes and macrophages in HTLV-1 infection. Our aim was to determine the frequency of monocytes subsets, expression of co-stimulatory molecules and evaluate the microbicidal ability of macrophages from HTLV-1 infected subject and to produce cytokines and chemokines. Participated in this study 26 HTLV-1 infected subjects and 19 healthy controls not infected with the virus. The frequencies of monocytes subsets and expression of co-stimulatory molecules were performed by flow cytometry. Macrophages were infected with *L. braziliensis* or stimulated with LPS. The percentage of infected macrophages and the number of amastigotes/100 macrophages were evaluated by optic microscopy. Measurements of cytokines and chemokines were performed by ELISA from the supernatants of these cells. There was no statistically significant difference between groups in the frequency of monocyte subpopulations and its activation. Macrophages from HTLV-1 infected subjects were infected with *L. braziliensis* at the same ratio than macrophages from healthy controls, and both groups had the same ability to kill this parasite. Macrophages from HTLV-1 infected subjects produced more TNF- α , CXCL9, CXCL10 and CCL5, and less IL-10 than macrophages from healthy controls. While there was no correlation between IFN- γ and cytokine/chemokine production by macrophages, there was a correlation between proviral load and levels of TNF- α and CXCL10. There is dissociation between the inflammatory response and microbicidal capacity of macrophages from HTLV-1 infected subjects. The increased susceptibility to other pathogens in HTLV-1 is not due to decreasing ability of macrophages killing, and may

be related to the exaggerated inflammatory response mediated by both macrophages and T cells.

Author Summary

The Human T lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) is the causative agent of adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL), HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and other clinic manifestations such as infectious dermatitis, overactive bladder and HTLV-1 associated arthropathy. It is known that HTLV-1 infection increases susceptibility and severity to other infectious diseases, but why this happens is not well understood. Monocytes and macrophages play important roles in the defense against pathogens, and their functions in HTLV-1 infection are poorly studied. We observed that monocytes from HTLV-1 infected subjects showed similar frequencies and activation than what were observed in individuals not infected by the virus. Additionally, macrophages from HTLV-1 infected subjects showed a high inflammatory profile, by producing more TNF- α , CXCL9, CXCL10 and CCL5, and less IL-10 than macrophages from healthy controls. We observed that there was a correlation between IFN- γ produced by peripheral blood mononuclear cells and cytokine/chemokine production by macrophages, but there were a direct correlation between proviral load and TNF- α and CXCL10 levels. These data indicates that viral factors could alter the inflammatory activity of cells of the innate immune response, and this may contribute to increased susceptibility to other infectious agents observed in HTLV-1 infected subjects.

Background

The Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infects about 15 to 20 million people worldwide, with endemic foci in virtually all continents [1,2]. A large proportion of individuals remain asymptomatic until the end of life, but few people will develop a malignant lymphoproliferative disease called adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL) [3] or a chronic neurodegenerative inflammatory disease called HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) [4,5]. Additionally, more than 40% of infected individuals will present clinical manifestations, such as infectious dermatitis [6], polymyositis [7], sicca syndrome [8,9], overactive bladder and/or erectile dysfunction [10,11], chronic periodontitis [12] and HTLV-1 associated arthropathy among other diseases [13,14,15]. The pathogenesis of diseases associated to HTLV-1 is related predominantly to the proviral load and the exaggerated inflammatory response in HTLV-1 infection [16,17].

The HTLV-1 infects predominantly CD4 T cells, but T CD8 cells [18], monocytes/macrophages [19,20] and dendritic cells [21] are also infected by the virus. The infection is characterized by a high spontaneous proliferation and activation of T cells, leading to high production and secretion of inflammatory mediators, such as TNF- α , IFN- γ , CXCL9 and CXCL10 [16,22]. The immunological studies have directed attention to the role of T cells in HTLV-1 infection, and seek to correlate the dysfunctions of the adaptive immune system with the development of diseases or clinical manifestations associated with the virus. Very few studies have evaluated the role of the innate immune response in HTLV-1 infection. It is well known that HTLV-1 infection increases susceptibility and severity to other infectious diseases [23,24,25]. The mechanism involved in the increased susceptibility of HTLV-1 infected subjects to other infectious agents is only partially known. It has been documented in patients co-infected with HTLV and strongyloidiasis that the exacerbated Th1

immune response caused by the viral infection decreases IL-4, IL-5, IL-13 and IgE production, molecules that participated in the defense mechanism against helminthes [26,23]. Regarding intracellular pathogens, despite the high IFN- γ and TNF- α production there is an increased susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* [27,28,29] and fungal infections [30]. It is known that cells of the innate immunity response, such as neutrophils and macrophages, are the most important effectors cells against infectious agents. However very few studies have evaluated monocytes, macrophages, neutrophils or dendritic cells (DCs) function in HTLV-1 infection. It is known that there is a spontaneous activation of neutrophils documented by decreasing in the number of neutrophils expressing CD62L and higher expression of CD66b [31,32]. Regarding to DCs, some studies showed an increased expression of molecules involved in virus internalization process and T cells adhesion (DC-SIGN) [33,34], and a decreasing in CD14 and CD1a, molecules related with derived-monocytes DCs maturation [35,36]. Moreover, DCs from HTLV-1 infected patients show an impaired expression of CD83, CD86, HLA-DR after stimulation with TNF- α and reduced ability to stimulate T cells non-infected with the virus [35]. A recently study documented that CD14⁺ monocytes co-cultivated with HTLV-I-infected breast milk macrophages stimulated with GM-CSF and IL-4 do not differentiate to mature DCs, with a decreased expression of CD1a, CD1b, CD11b, DC-SIGN e HLA-DR [37].

These and others dysfunctions in the myeloid cell lineage may modify the immune response of HTLV-1 infected subjects to a biased antigen. Minocycline a mononuclear phagocyte inhibitor, decrease the expression of TNF- α and IL-1 β in CD14⁺ cells from HAM/TSP patients, and this led to decreased in spontaneous T CD8⁺ cells and IFN- γ production by these cells [38]. This data showed the importance of the role of monocytes in HTLV-1 infection, particularly in HAM/TSP cases.

It has been also documented that depletion of macrophages from cells culture of patients with ATLL resulted in a decreased of IL-2 production while addition of macrophages or IL-6 and IL-1 (cytokines produced by macrophages) restored IL-2 production [39]. IL-2 induces T cells proliferation and induces cellular survival and these data indicate that macrophages participate in cell immortalization and development of ATLL. However it is not clear why HTLV-1 infection increases susceptibility and severity of infections caused by other pathogens. The aim of the presenting study was to evaluate the frequency of monocytes subsets in HTLV-1 infected subjects, to determine the ability of monocyte-derived macrophages from HTLV-1 infected subjects to produce cytokines and chemokines and to kill the intracellular pathogen *Leishmania braziliensis*.

Methods

1) Study design, HTLV-1 infected subjects and healthy controls

This is a cross-sectional study with the purpose of evaluate the role of myeloid lineage cells (monocytes and macrophages) from HTLV-1 infected subjects. 26 HTLV-1 infected subjects (19 asymptomatic HTLV-1 carriers and 7 individuals diagnosed with HAM/TSP) followed in the HTLV-1 clinic of the Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES), Federal University of Bahia, Brazil participated of the study. Were excluded individuals co-infected with another pathogen, pregnant woman and individuals in use of immunomodulators drugs. The diagnostic of HTLV-1 infection was established by antibody detection by ELISA (Murex HTLV-I+II, Abbot, Dartford, UK) and confirmed by Western blot (HTLV blot 2.4, Genelabs. Singapore). The motor dysfunction and neurological involvement were analyzed by Osame's motor disability score (OMDS) [40] and Expanded disability status scale (EDSS) [41]. Individuals with an OMDS and EDSS equal to 0 were considered HTLV-1 asymptomatic carriers. Patients with OMDS ≥ 1 and presence of specific antibodies against HTLV-1 in the cerebrospinal fluid were diagnosed with HAM/TSP. 19 individuals non infected with the HTLV-1 constituted the healthy control's group. The study was approved by the Ethics committee from the Federal University of Bahia and all patients signed an informed consent (N° 035/2013).

2) DNA extraction and HTLV-1 proviral load

DNA was extracted from 10^6 cells using proteinase K and salting-out method. The HTLV-1 proviral load was quantified using a real-time TaqMan PCR method [42]. Albumin DNA was used as an endogenous reference. Amplification and data acquisition were carried out using

the ABI Prism 7700 Sequence detector system (Applied Biosystems). Standard curves were generated using a 5-fold serial dilution of a double-stranded plasmid (pcHTLV-ALB). All standard dilutions and control and individual samples were run in duplicate for both HTLV-1 and albumin DNA quantification. The normalized value of the HTLV-1 proviral load was calculated as the ratio of (HTLV-1 DNA average copy number/albumin DNA average copy number) $\times 2 \times 10^6$ and expressed as the number of HTLV-1 copies/ 10^6 cells.

3) Collection and culture of peripheral blood mononuclear cells

The peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained from heparinized blood of HTLV-1 infected subjects and healthy controls, and separated by density gradient with Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Bio – Sciences, Uppsala, Sweden) PBMCs from the interface were aspirated and washed with saline. After that, these cells were resuspended in RPMI 1640 culture medium with L-glutamine and 25 mM HEPES (Gibco BRL, Grand Island, New York, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum and 0.5% gentamicin at 10 mg/mL (Gibco BRL, Grand Island, New York, USA). Then PBMCs were directed to three separate experiments: a) they were stained with specific antibodies for monocytes experiments by flow cytometry; b) cultured for determination of spontaneous production of IFN- γ by PBMCs. 3×10^6 cells/mL were incubated unstimulated and stimulated with PHA (5 μ g/mL) at 37°C in 5% CO₂ for 72 hours and then the supernatant was frozen for later determination of IFN- γ ; or c) or used for the differentiation of cultured monocytes into macrophages, 5×10^6 cells/mL. These cells were added to 4-hole plates (Lab-Tek® Permanox® Chamber Slide™, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) and incubated for 2 hours at 37°C and 5% CO₂. Cells that did not adhere to the blades were removed by washing. The adherent cells (monocytes) were differentiated into macrophages after 6 days of culture at 37°C in 5% CO₂.

4) Frequency of monocytes subsets and expression of co-stimulatory molecules

The ex vivo frequency of monocytes subsets and expression of HLA-DR, CD80 and CD86 was performed using PBMCs from HTLV-1 asymptomatic infected carriers infected and healthy controls stained with monoclonal antibodies (anti-CD14-FITC, anti-CD16-PE-Cy5, anti-HLA-DR-PE, anti-CD80-PE e anti-CD86-PE, from eBioscience, San Diego, CA or R&D Systems, Minneapolis, MN) for 20 minutes at 4°C. PBMCs were washed with PBS and then fixed with 2% paraformaldehyde. After this period, the cells were then analyzed on the flow cytometer (II FacsCanto, BD Biosciences, San Jose, CA) analysis was made on FlowJo software version 7.6 (TreeStar, Ashland, OR). The monocyte population was selected from the size and cell granularity and then subdivided into classical (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺CD16⁺) and non-classical monocytes (CD14⁺CD16⁺⁺). Data of the expression of HLA-DR, CD80 and CD86 are represented as mean fluorescence intensity (MIF).

5) Culture and preparation of *Leishmania braziliensis*

A strain of *L. braziliensis* isolated from a patient with cutaneous leishmaniasis from the endemic area of Corte de Pedra, Salvador, Bahia, are being kept cryopreserved in Immunology Service. Parasites were initially cultivated in tubes with biphasic medium (NNN) supplemented with 10% fetal bovine serum and maintained in culture in Schneider medium (LGC Biotechnology, São Paulo, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin streptomycin and glutamine (Gibco BRL, Grand Island, New York, USA) for expansion and proliferation of protozoa.

6) Macrophages infection with *L. braziliensis*

To accomplish this infection, *L. braziliensis* promastigotes were maintained in Schneider medium until the stationary or infective phase. Then, parasites were centrifuged and resuspended in RPMI 1640 medium and used to infect macrophages infected and control individuals not infected with HTLV-1. Stimulated and non-stimulated macrophages with LPS (100 ng/mL) were used as controls. The lipopolysaccharide (LPS) is an endotoxin derived from gram-negative bacteria, widely used as a stimulant of macrophage. Infection with *L. braziliensis* was performed at a 5 parasites to 1 cell ratio for 2 hours at 35°C in 5% CO₂. The parasites which remained outside of the cells after the incubation period were removed by washing, and then the cells were incubated at 37°C and 5% CO₂.

7) *L. braziliensis* counting to determine the percentage of infected cells and the amount of intracellular amastigotes

The percentage of infected macrophages with *L. braziliensis* and the number of amastigotes in 100 macrophages were evaluated by optical microscopy after 2, 48 and 72 hours of infection and staining with Giemsa. Counts were performed by two independent observers who were unaware that the blade was from a HTLV-1 infected subject or from a healthy control. The end result is the average of the results of both observers. Culture supernatants of these cells (not stimulated, stimulated with LPS and *L. braziliensis* infection) were collected and frozen at -20°C until used for determining the levels of cytokines and chemokines.

8) Measurement of cytokines and chemokines by ELISA

IFN- γ level was determined in the PBMCs culture supernatants after 72 hours of incubation, and the TNF- α , IL-10, CXCL9, CXCL10 and CCL5 levels were determined in macrophage culture supernatants after 48 hours of incubation and performed by ELISA, using commercial

kits and following the manufacturer's instructions (DuoSet R&D Systems, Minneapolis, MN, USA and BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Due to the limited amount of cells some experiments did not included all patients.

9) Statistical analyses and data representation

Mann-Whitney test was used to assess differences between the two groups under the same conditions. Fisher's exact test was used to analyze gender between groups. Wilcoxon test was used to evaluate the influence of stimuli (LPS and *L. braziliensis*) compared to condition without stimulation. Spearman correlation test was used in the correlations between concentrations of cytokines, chemokines and proviral load. Data were expressed as median and range (minimum and maximum values). GraphPad Prism 5 (San Diego, CA) carried out the statistical evaluation and a $P < 0,05$ were considered to indicate a significant difference.

Results

Monocytes subsets frequency and expression of cell surface co-stimulatory molecules

The frequency of monocytes subsets frequency (classical, intermediate and non-classical monocytes) and expression of cell surface co-stimulatory molecules in HTLV-1 asymptomatic infected subjects and healthy controls are shown in Figure 1, and these assays were performed by flow cytometry. HTLV-1 asymptomatic infected subject's group shown a similar monocytes subsets frequency than that observed in the healthy control group. 87,5% of monocytes from healthy controls were classical, while 6,45% were intermediate and 4,9% were non-classical. 85% of monocytes from HTLV-1 asymptomatic carriers were classical, 6,5% were intermediate and 7,5% were non-classical monocytes (Figure 1A). There was also no difference in the expression of HLA-DR, CD80 and CD86 by monocytes between HTLV-1 asymptomatic infected subjects and healthy controls (Figure 1B, 1C, and 1D).

Macrophage microbicidal ability after *L. braziliensis* infection

To evaluate the susceptibility of HTLV-1 infected subject's macrophages to be infected by an intracellular pathogen and the ability of these cells to kill it, macrophages were infected by *L. braziliensis* at a 5:1 ratio. The percentage of infected macrophages and the number of amastigotes/100 macrophages were evaluated by optic microscopy after 2, 48 and 72 hours of infection, and are shown in Figure 2. There is no difference in the microbicidal activity between macrophages from HTLV-1 infected subjects and from healthy controls, after those three times of infection by *L. braziliensis*. Macrophages from HTLV-1 infected subjects were infected by this protozoan at the same proportion than macrophages from healthy individuals (Figure 2A), and there was an also similar amount of *L. braziliensis* amastigotes inside the cells after 2, 48 and 72 hours of infection in these two groups studied (Figure 2B).

Cytokine and chemokine profile produced by macrophages in HTLV-1 infection

Levels of TNF- α and IL-10 were evaluated in the supernatants from HTLV-1 infected subjects (asymptomatic and HAM/TSP) and healthy control's macrophages cultures after 48 hours of incubation. These assays were performed by ELISA and data are shown in Figure 3. Macrophages from healthy controls as macrophages from HTLV-1 infected did no produce spontaneously significant detectable levels of TNF- α (3 pg/mL vs 13 pg/mL, respectively). When macrophages from both groups studied were stimulated with LPS, high levels of TNF- α were detected. Macrophages from healthy controls produced 2,160 pg/mL while macrophages from HTLV-1 infected subjects produced 2,112 pg/mL, but is was not find a significant difference between these two values. After *L. braziliensis* infection, only macrophages from HTLV-1 infected individuals were capable to increase the production of TNF- α when compared with the spontaneous production of this cytokine (the TNF- α level changed from 13 pg/mL to 53 pg/mL, $P = 0,01$), while in the healthy control's group the production was 4,5 pg/mL. Additionally, HTLV-1 infected subject's macrophages produced more TNF- α after infection with *L. braziliensis* then healthy control's macrophages ($P = 0,003$) (Figure 3A). HTLV-1 infected and healthy control's macrophages were not capable to produce IL-10 in significant levels even spontaneously (12 pg/mL vs 11 pg/mL respectively) or when infected with *L. braziliensis* (0 pg/mL in both groups). However when macrophages were stimulated with LPS, both groups shown a small increase in IL-10 production, but macrophages from healthy controls produced more this cytokine than macrophages from HTLV-1 infected subjects (258 pg/mL vs 41 pg/mL respectively, $P = 0,02$) (Figure 3B). Levels of CXCL9, CXCL10 and CCL5 were evaluated in the supernatants from HTLV-1 infected subjects (asymptomatic and HAM/TSP) and healthy control's macrophages cultures after 48 hours of incubation. These assays were performed by ELISA and data are shown in

Figure 4. HTLV-1 infected subject's macrophages spontaneously produced more CXCL9 than macrophages from healthy controls (32,992 pg/mL vs 1,573 pg/mL, $P = 0,0009$). Macrophages from infected subjects also produced more CXCL9 than healthy control's macrophages after LPS stimulus (33,253 pg/mL vs 10,524 pg/mL, $P = 0,0007$) or after infection by *L. braziliensis* (22,114 pg/mL vs 5,991 pg/mL, $P = 0,006$) (Figure 4A). As observed with the CXCL9 production, HTLV-1 infected subject's macrophages produced higher levels of CXCL10 spontaneously than macrophages from healthy individuals (3,865 pg/mL vs 86 pg/mL, $P = 0,004$), however the addition of LPS to the culture stimulated macrophages from these healthy controls to produce CXCL10 (changing from the spontaneous production of 86 pg/mL to 5,627 pg/mL, $P = 0,002$), while in the HTLV-1 infected subjects group the production continued the same after stimulus (changing from 3,865 pg/mL to 3,938 pg/mL). There was no statistical difference in the production of CXCL10 between both groups studied when stimulated with LPS. When macrophages from HTLV-1 infected subjects were infected with *L. braziliensis*, the production of CXCL10 decreased from 3,865 pg/mL to 1,725 pg/mL ($P = 0,01$), while the increase level of this chemokine was observed in the healthy control's group (changing from 86 pg/mL to 422 pg/mL, $P = 0,03$). There was no statistical difference in the production of CXCL10 by macrophages after infection by *L. braziliensis* between both groups (Figure 4B).

Macrophages from HTLV-1 infected subjects spontaneously produced more CCL5 than healthy control's macrophages (832 pg/mL vs 383 pg/mL respectively, $P = 0,006$). When macrophages were stimulated with LPS, even macrophages from HTLV-1 infected subjects than macrophages from healthy individuals produced the same levels of CCL5 (1,090 pg/mL in both groups). After *L. braziliensis* infection, macrophages from HTLV-1 infected subjects produced more CCL5 than healthy control's macrophages (797 pg/mL vs 300 pg/mL respectively, $P = 0,0009$) (Figure 4C).

Correlation between IFN- γ produced by PBMCs and cytokines and chemokines produced by macrophages from HTLV-1 infected individuals

To evaluate if the production of IFN- γ by PBMCs is associated with production of TNF- α , IL-10, CXCL9, CXCL10 and CCL5, correlations were performed using Spearman correlation and r significance test. There are no correlations between IFN- γ and those cytokines and chemokines in HTLV-1 infected patients (data not shown).

Correlation between proviral load and IFN- γ produced by PBMCs and TNF- α , CXCL9 and CXCL10 produced by macrophages from HTLV-1infected individuals

Correlations between proviral load and IFN- γ produced by PBMCs, TNF- α , CXCL9 and CXCL10 produced by macrophages were performed using Spearman correlation and r significance test, and are shown in Figure 5. It was observed a positive correlation between proviral load and IFN- γ ($r = 0,64$ and $P = 0,001$), and between proviral load and TNF- α ($r = 0,51$ and $P = 0,01$) and CXCL10 ($r = 0.63$ e $P = 0,05$). There was no correlation between proviral load and the CXCL9 production by HTLV-1 infected individual's macrophages ($r = 0,26$ and $P = 0,24$) (Figure 5).

Discussion

The T cell response has been well studied in HTLV-1 infection. It is characterized by the increased expression of proinflammatory cytokines, such as TNF- α and IFN- γ , and increased production of IL-2, that maintain T CD4⁺ and CD8⁺ T cells proliferation [16,22]. In contrast very little is known about the innate immunity in this infection. Here we documented that the frequency and degree of activation of classical, intermediate and non-classical monocytes in HTLV-1 carriers is similar to that observed in monocytes from healthy controls, and that the

microbicidal ability from HTLV-1 infected subject's macrophages is preserved. Nevertheless, macrophages from HTLV-1 infected individuals produced spontaneously or after stimulus more TNF- α , CXCL9, CXCL10 and CCL5, and less IL-10 than macrophages from healthy controls. Indeed there was a correlation between proviral loads and cytokine/chemokine production.

The HTLV-1 infection is associated with a high susceptibility to other infectious agents, such as *Strongyloides stercoralis* [23], *Schistosoma mansoni* [24] and *Mycobacterium tuberculosis* [25,27,28,29]. Additionally, this infection also interferes with the clinical forms of other infectious diseases, increasing severity and/or mortality as observed in strongyloidiasis, tuberculosis, fungal infections and scabies. As it is known that monocytes and macrophages play a key role in the defense mechanisms against pathogens, the evaluation of the myeloid cell function in HTLV-1 infection may contribute to explain immunologic abnormalities during this viral infection as well as how HTLV-1 modify the clinical course of other infectious diseases.

It is known that monocytes are a heterogeneous population of cells and based on the expression of CD4 and CD16 they can be classified as classic, intermediate and non-classic. It is already known that monocytes are activated by IFN- γ , but we did not find that the Th1 environment of HTLV-1 infection characterized by increasing production in IFN- γ and TNF- α modified the frequency of monocyte subsets. Furthermore, monocytes from HTLV-1 infected subjects expressed HLA-DR, CD80 and CD86 at similar levels than monocytes from healthy controls. It is known that intermediate monocytes are the main source of TNF- α among the three subpopulations [43]. As PBMCs from HTLV-1 infected subjects produce more proinflammatory mediators as CXCL9, CXCL10 and TNF- α than PBMCs from healthy controls [16,44], one could expect that there were a higher frequency of intermediate monocytes in this group but it was not observed. Additionally, PBMCs from HAM/TSP

patients produce higher levels of inflammatory cytokines HTLV-1 carriers [16]. As for these experiments we only evaluated HTLV-1 carriers it can not be ruled out that assess the frequency of subpopulations of monocytes in patients with HAM/TSP may show different results. However as some HTLV-1 carriers had cytokine production similar to patients with HAM/TSP our data indicate that the immunologic environment does not play a major role in the frequency of monocyte subsets.

Macrophages kills infectious agents at tissue level but may also serve as habitat for intracellular pathogens. As HTLV-1 infection increases the susceptibility to others infections caused by intracellular agents such as *M. tuberculosis*, it is important to evaluate macrophage function in HTLV-1 infection. To evaluate macrophage killing we used *L. braziliensis*, an intracellular pathogen knowing to interact with TLR2, TLR4 and TLR9 [45,46] and with ability to multiply in macrophages. As the number of leishmanias inside the macrophages after 2 hours of infection was similar to that observed in the healthy control's group, it was concluded that penetration and/or phagocytosis of *L. braziliensis* was equal in both groups. Moreover the leishmania killing evaluated at 48 hours and 72 hours expressed by the number of amastigotes in macrophages was similar. This data extended and is in agreement with our previous observations that the ability of neutrophils from HTLV-1 infected subjects to kill leishmania is preserved [32]. As IFN- γ is the main cytokine that activate macrophage and high IFN- γ production is observed in HTLV-1 infected subjects, one could expect that macrophages from HTLV-1 carriers had greater ability to kill an intracellular pathogen. But once more we did not find that the marked Th1 environment observed in HTLV-1 infection modified the killing ability of myeloid cells.

Macrophages activation has been used to indicate both, increasing ability of killing and secretion of molecules such as chemokines and cytokines. Macrophages are also a heterogeneous cells population and macrophage's subsets have been defined as classical

macrophages that are associated with a type 1 immune response, and alternative macrophages that secrete IL-4 and IL-10 [47]. Here we showed that killing ability and secretion of cytokines are not associated. While we did not observe an increase in the killing ability macrophage from HTLV-1 infected subjects, unstimulated cells or after *L. braziliensis* infection or LPS stimulation produced higher levels of TNF- α , CXCL9 and CXCL10 than healthy subject's macrophages. In addition to these pro-inflammatory molecules there was also a high secretion of CCL5, a cytokine related to a Th2 immune response in absence of stimulus or after infection with *L. braziliensis*. This indicates that HTLV-1 infection did not hamper the Th2 immune response at the level of innate immunity. This is also in agreement with the observation that atopic diseases may occur in HTLV-1 infection [30] and that PBMC from HTLV-1 carriers produce higher amount of Th2 cytokines than cells from healthy subjects [16].

While infection by *L. braziliensis* did not stimulate IL-10 production in both groups, the production of this cytokine by macrophages stimulated with LPS was greater in cells from healthy individuals than in HTLV-1 infected subjects. This is a relevant data, since is known that PBMCs from HTLV-1 carriers produce more IL-10 than PBMCs from individuals non-infected with the virus [48]. As we did not detect increased production of IL-10 by unstimulated or *L. braziliensis* infected macrophages it is possible that the major source of IL-10 in HTLV-1 infected individuals are T cells.

Several possibilities may explain why unstimulated cells or *L. braziliensis* stimulated macrophages from HTLV-1 infected individuals produced high amount of TNF- α and CXCL9. It is possible that cells from HTLV-1 infected subjects have this better response due to have greater number of binding sites to this infectious agent. It is known that *Leishmania sp* interact with TLR2, TLR4 and TLR9 expressed in macrophages [45,46]. So it is necessary to determine whether macrophages from HTLV-1 infected individuals have higher expression

of these receptors. Second HTLV-1 is characterized by increased production of IFN- γ the main cytokine that activate macrophages. Although the high production of proinflammatory mediators documented in HTLV-1 infection such as IFN- γ , IL-1, IL-6 could contribute to the increased production of chemokines and TNF- α by macrophages, we did not find a correlation between the IFN- γ production by PBMCs and TNF- α , IL-10, CXCL9, CXCL10 and CCL5 levels. Viral factors could contribute to increased production of cytokines and chemokines. Actually the documentation of a direct correlation between proviral load and TNF- α and CXCL10 levels indicates that the HTLV-1 by itself or by inducing soluble mediators is the most important factor responsible for the increased ability of macrophages to produce cytokine during HTLV-1 infection.

This is the first study that evaluated the monocytes subsets and activation markers on these cells, as well as the inflammatory and microbicidal activity from macrophages in HTLV-1 infection. Our data indicate that HTLV-1 infection does not alter the frequency of monocytes subsets, and these cells have the same degree of activation than monocytes from healthy controls. Concerning to macrophages, it was observed that cells from HTLV-1 infected subjects have the same ability to phagocyte and kill an intracellular pathogen than healthy control's macrophages, but this proinflammatory activity is higher in HTLV-1 infected subjects. The dissociation between microbicidal activity and production of proinflammatory cytokines is an important aspect in infectious diseases as in many diseases despite control of the infectious agents, pathology is documented due to intensity of the inflammatory response. Therefore while the viral infection and the predominant production of Th1 cytokines keep an exaggerated inflammatory response that could lead to pathology, it does not contribute to a higher ability of macrophages to kill intracellular agents.

Acknowledgments

We are grateful to the staff and patients of HTLV-1 clinic of the Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos. We also thank Érica Castilho for the preparation of the manuscript.

References

1. Edlich RF, Hill LG, Williams FM. (2003) Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I): an update. *J Long Term Eff Med Implants*. 13: 127-140.
2. Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. (2005) Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24: 6058-6068.
3. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, et al. (1980) Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 7415-7419.
4. Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, et al. (1985) Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2: 407-410.
5. Osame M. (2002) Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *J Neurovirol* 8: 359-364.
6. LaGrenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W. (1990) Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet* 336: 1345-1347.
7. Morgan OS, Rodgers-Johnson P, Mora C, Char G. (1989) HTLV-I and polymyositis in Jamaica. *Lancet* 2: 1184-1187.

8. Giozza SP, Santos SB, Martinelli M, Porto MA, Muniz AL, et al. (2008) Salivary and lacrymal gland disorders and HTLV-1 infection. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 109: 153-157.
9. Eguchi K, Matsouka N, Ida N, Nakashima M, Sakai M, et al. (1992) Primary Sjogren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. *Ann Rheum Dis* 51: 769-776.
10. Castro NM, Oliveira P, Freitas D, Rodrigues W, Muniz A, et al. (2005) Erectile dysfunction and HTLV-I infection: a silent problem. *Int J Impot Res* 17: 364-369.
11. Castro NM, Rodrigues WJr, Freitas DM, Muniz A, Oliveira P, et al. (2007) Urinary symptoms associated with human T-cell lymphotropic virus type I infection: evidence of urinary manifestations in large group of HTLV-I carriers. *Urology* 69: 813-818.
12. Garlet GP, Giozza SP, Silveira EM, Claudino M, Santos SB, et al. (2010) Association of human T lymphotropic virus 1 amplification of periodontitis severity with altered cytokine expression in response to a standard periodontopathogen infection. *Clin Infect Dis* 50: 11-18.
13. Siqueira IS, Muniz AL, Oliveira P, Carvalho AD, Orge GO, et al. (2009) Manifestações Clínicas em pacientes infectados pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV). *Gaz. méd. Bahia* 79: 25-29.
14. Caskey MF, Morgan DJ, Porto AF, Giozza SP, Muniz AL, et al. (2007) Clinical manifestations associated with HTLV type 1 infection: A cross-sectional study. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23: 365-371.

15. Souza A, Tanajura D, Toledo-Cornell C, Santos S, Carvalho EM. (2012) Immunopathogenesis and neurological manifestations associated to HTLV-1 infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 45: 545-552.
16. Santos SB, Porto AF, Muniz AL, de Jesus AR, Magalhães E, et al. (2004) Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC Infect Dis* 4: 7.
17. Furtado Mdos S, Andrade RG, Romanelli LC, Ribeiro MA, Ribas JG, et al. (2012) Monitoring the HTLV-1 proviral load in the peripheral blood of asymptomatic carriers and patients with HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from a Brazilian cohort: ROC curve analysis to establish the threshold for risk disease. *J Med Virol* 84: 664-671.
18. Manel N, Battini JL, Taylor N, Sitbon M. (2005) HTLV-1 tropism and envelope receptor. *Oncogene* 24: 6016-6025.
19. Koralnik IJ, Lemp JF Jr, Gallo RC, Franchini G. (1992) In vitro infection of human macrophages by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). *AIDS Res Hum Retroviruses* 8: 1845-1849.
20. de Revel T, Mabondzo A, Gras G, Delord B, Roques P, et al. (1993) In vitro infection of human macrophages with human T-cell leukemia virus type 1. *Blood* 81: 1598-1606.
21. Macatonia SE, Cruickshank JK, Rudge P, Knight SC. (1992) Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8: 1699-1706.

22. Itoyama Y, Minato S, Kira J, Goto I, Sato H, et al. (1988) Spontaneous proliferation of peripheral blood lymphocytes increased in patients with HTLV-I associated myelopathy. *Neurology* 38: 1302-1307.
23. Porto AF, Neva FA, Bittencourt H. (2001) HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunol* 23: 503-507.
24. Porto AF, Santos SB, Alcantara L, Guerreiro JB, Passos J, et al. (2004) HTLV-1 modifies the clinical and immunological response to schistosomiasis. *Clin Exp Immunol* 137: 424-429.
25. Pedral-Sampaio DB, Martins Netto E, Pedrosa C, Brites C, Duarte M, et al. (1997) Co-Infection of tuberculosis and HIV/HTLV retroviruses: frequency and prognosis among patients admitted in a Brazilian hospital. *Braz J Infect Dis* 1: 31-35.
26. Porto MA, Alcântara LM, Leal M, Castro N, Carvalho EM. (2005) Atypical clinical presentation of strongyloidiasis in a patient co-infected with human T cell lymphotropic virus type I. *Am J Trop Med Hyg* 72: 124-125.
27. Marinho J, Galvão-Castro B, Rodrigues LC, Barreto ML. (2005) Increased risk of tuberculosis with human T lymphotropic virus I infection: A case-control study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 40: 625-628.
28. de Lourdes Bastos M, Osterbauer B, Mesquita DL, Carrera CA, Albuquerque MJ, et al. (2009) Prevalence of HTLV-1 infection in hospitalized patients with tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 13: 1519-1523.
29. Bastos Mde L, Santos SB, Souza A, Finkmoore B, Bispo O, et al. (2012) Influence of HTLV-1 on the clinical, microbiologic and immunologic presentation of tuberculosis. *BMC Infect Dis* 12: 199.

30. Dantas L, Netto E, Glesby MJ, Carvalho EM, Machado P. (2013) Dermatological manifestations of individuals infected with human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Int J Dermatol* doi: 10.1111/ijd.12170.
31. Guerreiro JB, Porto MA, Santos SB, Lacerda L, Ho JL, et al. (2005) Spontaneous neutrophil activation in HTLV-1 infected patients. *Braz J Infect Dis* 9: 510-514.
32. Bezerra CA, Cardoso TM, Giudice A, Porto AF, Santos SB, et al. (2011) Evaluation of the microbicidal activity and cytokines/chemokines profile released by neutrophils from HTLV-1-infected individuals. *Scand J Immunol* 74: 310-317.
33. Jain P, Manuel SL, Khan ZK, Ahuja J, Quann K, et al. (2009) DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *J Virol* 83: 10908–10921.
34. Svajger U, Anderluh M, Jeras M, Obermajer N. (2010) C-type lectin DC-SIGN: An adhesion, signalling and antigen-uptake molecule that guides dendritic cells in immunity. *Cell Signal* 22: 1397-1405.
35. Nascimento CR, Lima MA, de Andrada Serpa MJ, Espindola O, Leite AC, et al. (2011) Monocytes from HTLV-1-infected patients are unable to fully mature into dendritic cells. *Blood* 117: 489-499.
36. Makino M, Wakamatsu S, Shimokubo S, Arima N, Baba M. (2000) Production of functionally deficient dendritic cells from HTLV-I-infected monocytes: implications for the dendritic cell defect in adult T cell leukemia. *Virology* 274: 140-148.
37. Inagaki S, Takahashi M, Fukunaga Y, Takahashi H. (2012) HTLV-I-infected breast milk macrophages inhibit monocyte differentiation to dendritic cells. *Viral Immunol* 25: 106-116.

38. Enose-Akahata Y, Matsuura E, Tanaka Y, Oh U, Jacobson S. (2012) Minocycline modulates antigen-specific CTL activity through inactivation of mononuclear phagocytes in patients with HTLV-I associated neurologic disease. *Retrovirology* 9: 16.
39. Arima N, Daitoku Y, Hidaka S, Yamamoto Y, Fujimoto K, et al. (1992) Interleukin-2 production by primary adult T cell leukemia tumor cells is macrophage dependent. *Am J Hematol* 41: 258-263.
40. Izumo S, Goto I, Itoyama Y, Okajima T, Watanabe S, et al. (1996) Interferon-alpha is effective in HTLV-I-associated myelopathy: A multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. *Neurology* 46: 1016-1021.
41. Kurtzke JF. (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 33: 1444-1452.
42. Dehée A, Césaire R, Désiré N, Lézin A, Bourdonné O, et al. (2002) Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods* 102: 37-51.
43. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, et al. (2010) Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity* 33: 375-386.
44. Guerreiro JB, Santos SB, Morgan DJ, Porto AF, Muniz AL, et al. (2006) Levels of serum chemokines discriminate clinical myelopathy associated with human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) disease from HTLV-1 carrier state. *Clin Exp Immunol* 145: 296-301.
45. Tuon FF, Fernandes ER, Duarte MI, Amato VS. (2012) Expression of TLR2 and TLR4 in lesions of patients with tegumentary American leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 54: 159-163.

46. Vieira ÉL, Keesen TS, Machado PR, Guimarães LH, Carvalho EM, et al. (2013) Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. *Parasite Immunol* 35: 65-72.
47. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M. (2008) Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13: 453-61.
48. Carvalho EM, Bacellar O, Porto AF, Braga S, Galvão-Castro B, Neva F. (2001) Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 27: 1-6.

Figure Legends

Figure 1. Frequency of the monocytes subsets and expression of HLA-DR, CD80 and CD86. Monocytes from healthy controls (n = 12) and from HTLV-1 asymptomatic carriers (n = 13) were selected from the size and cell granularity and then subdivided into classical (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺CD16⁺) and non-classical monocytes (CD14⁺CD16⁺⁺). (A) Monocytes subsets frequency and expression of (B) HLA-DR, (C) CD80 and (D) CD86 in these monocytes. Symbols: (■) HTLV-1 asymptomatic infected subjects and (□) healthy controls. Data of the monocytes subsets frequency is represented by median. Data of the expression of HLA-DR, CD80 and CD86 are represented by median of the mean fluorescence intensity (MIF). Mann-Whitney test was used for statistical analyses (* $P < 0,05$).

Figure 2. Percentage of infected macrophages and number of amastigotes/100 macrophages from HTLV-1 infected subjects. Macrophages from healthy controls (n = 10) and from HTLV-1 infected subjects (n = 19) were infected by *L. braziliensis* at stationary phase at 5:1 ratio. (A) Percentage of infected macrophages and (B) the number of amastigotes/100 macrophages were evaluated after 2, 48 and 72 hour of infection. Symbols: (■) HTLV-1 infected subjects and (□) healthy controls. Data is represented by median. Mann-Whitney test was used for statistical analyses (* $P < 0,05$).

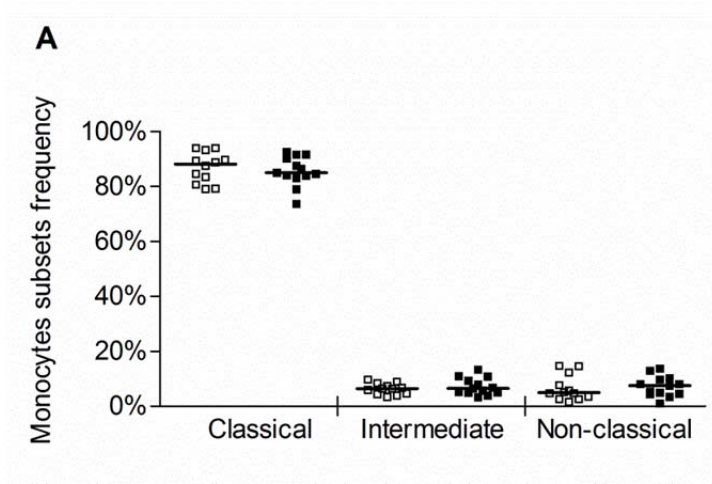
Figure 3. Production of TNF- α and IL-10 by macrophages from HTLV-1 infected subjects. Macrophages from HTLV-1 infected subjects were cultured without stimulus, with LPS or *L. braziliensis* (5:1 ratio) for 48 hours to evaluate (A) TNF- α (n = 26) and (B) IL-10

(N = 14) production. The production of these cytokines by healthy control macrophage's were used for data comparison. Black bars represent HTLV-1 infected subjects and white bars represent healthy controls. ELISA was used to measure TNF- α and IL-10 levels. Data is represented by median and range. Mann-Whitney test (* $P < 0,05$) and Wilcoxon T test (# $P < 0,05$) were used for statistical analyses.

Figure 4. Production of CXCL9, CXCL10 and CCL5 by macrophages from HTLV-1 infected subjects. Macrophages from HTLV-1 infected subjects were cultured without stimulus, with LPS or *L. braziliensis* (5:1 ratio) for 48 hours to evaluate (A) CXCL9 (n = 25), CXCL10 (n = 17) and (B) CCL5 (N = 16) production. The production of these chemokines by healthy control macrophage's were used for data comparison. Black bars represent HTLV-1 infected subjects and white bars represent healthy controls. ELISA was used to measure CXCL9, CXCL10 and CCL5 levels. Data is represented by median and range. Mann-Whitney test (* $P < 0,05$) and Wilcoxon T test (# $P < 0,05$) were used for statistical analyses.

Figure 5. Correlation between proviral load and IFN- γ produced by PBMCs, TNF- α , CXCL9 and CXCL10 produced by macrophages from HTLV-1 infected subjects. Correlation between HTLV-1 infected subjects proviral load and (A) IFN- γ produced by PBMCs (n = 22), (B) TNF- α (n = 22), (C) CXCL9 (n = 21), and (D) CXCL10 produced by macrophages (n = 10). Spearman correlation and r significance test were used for statistical analyses ($P < 0,05$).

Figure 1.



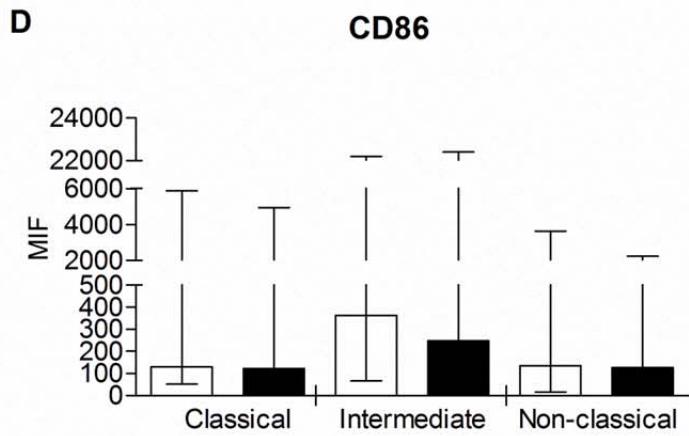
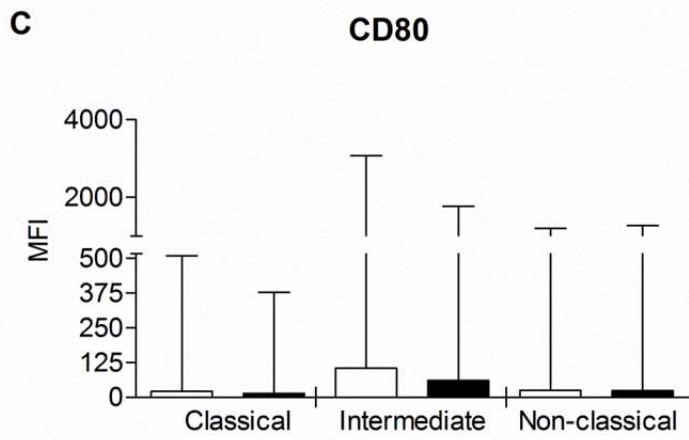
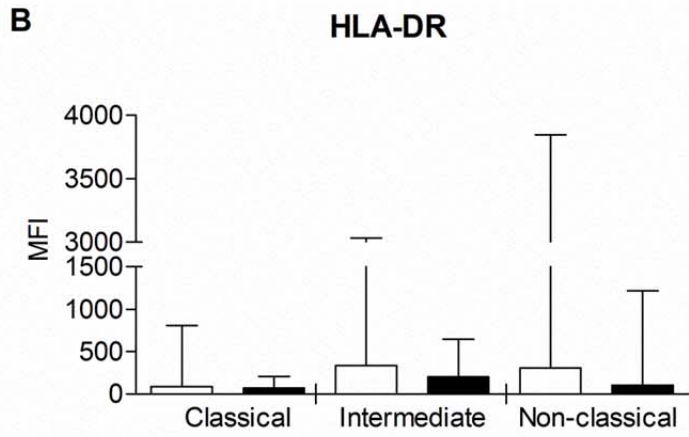


Figure 2.

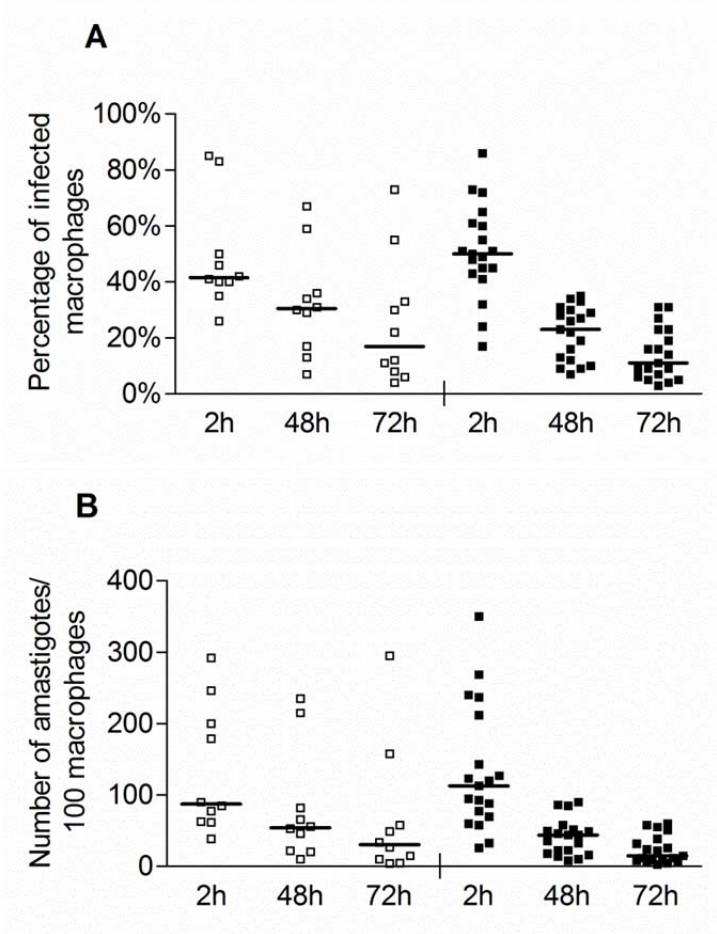


Figure 3.

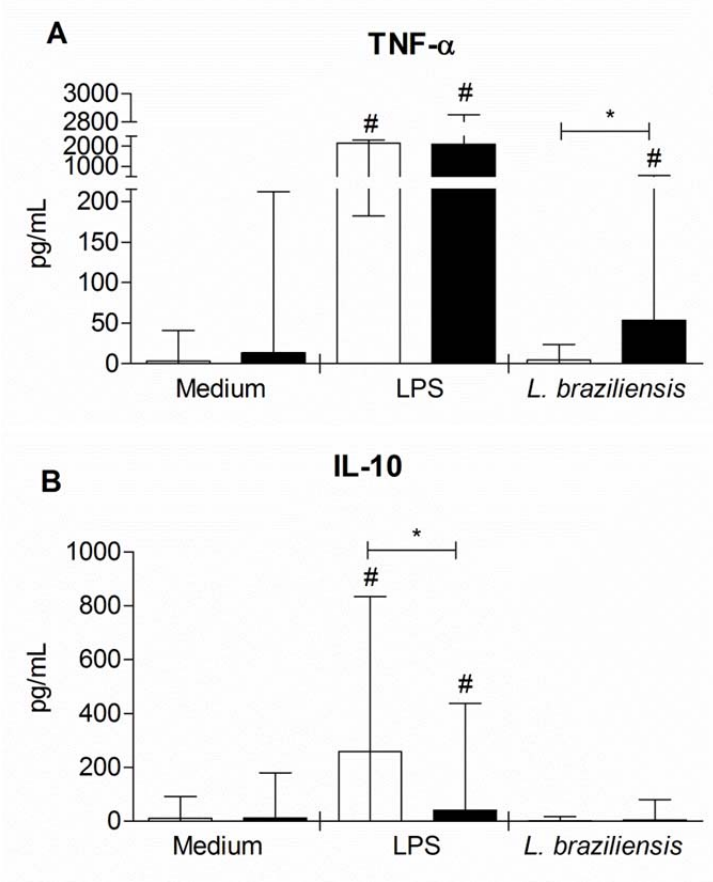


Figure 4.

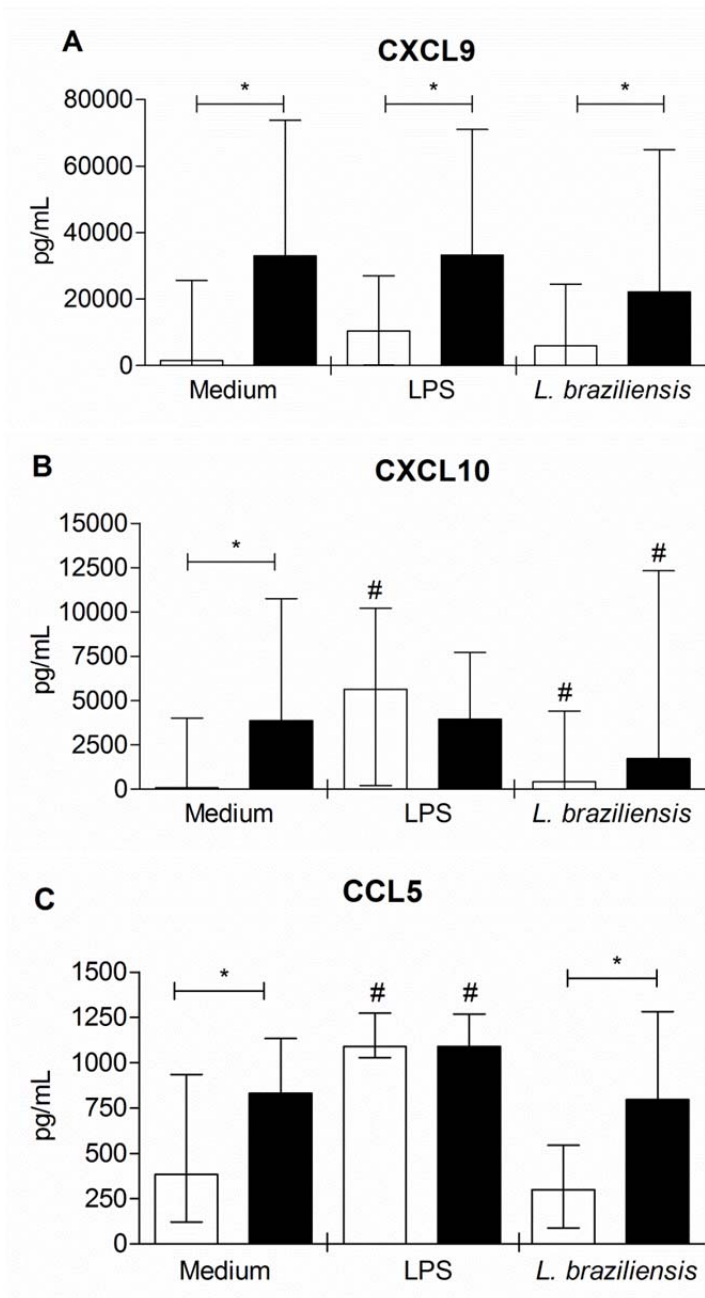
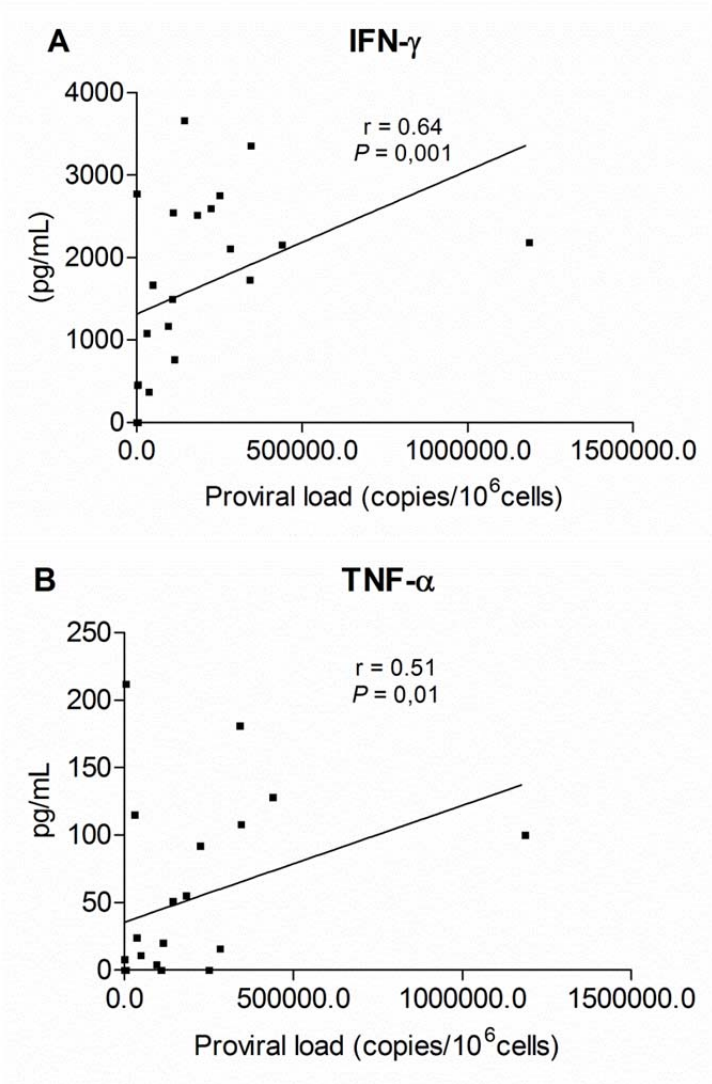
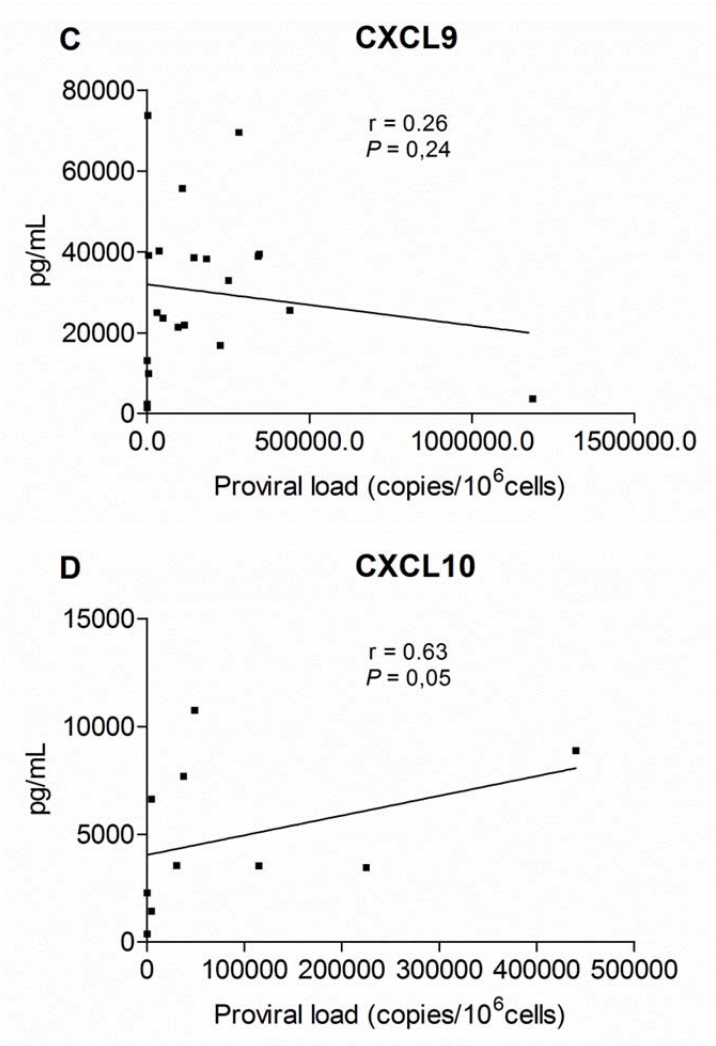


Figure 5.





ANEXO 4

Normas de publicação da revista PLOS Neglected of Infectious Diseases

PLOS Neglected Tropical Diseases Guidelines for Authors

Detailed below are guidelines for authors about the journal, open access, the editorial process, and the production process. We also provide a checklist for submitting manuscripts for the first time, a checklist for submitting revised manuscripts, and detailed guidelines for figure and table preparation. PLOS Neglected Tropical Diseases also offers several means of support to authors in developing countries.

Contents:

About PLOS Neglected Tropical Diseases

Open Access

Publication Charges

Criteria for Publication

Presubmission Inquiries

Overview of Editorial Process

Supporting Information and Materials Required at Submission

Preparation of Research Manuscripts

Organization of Manuscript

Nomenclature

Accession Numbers

Figure Guidelines

Multimedia Files and Supporting Information

Submission of Research Manuscripts

Checklist for Submitting New Manuscript

Checklist for Submitting Revised Manuscript

Other Types of Articles

Overview of the Production Process

Embargoes and the Media

1. About PLOS Neglected Tropical Diseases

PLOS Neglected Tropical Diseases is an open-access journal devoted to the pathobiology, epidemiology, prevention, treatment, and control of the neglected tropical diseases (NTDs), as well as public policy relevant to this group of diseases. The NTDs are defined as a group of poverty-promoting chronic infectious diseases, which primarily occur in rural areas and poor urban areas of low-income and middle-income countries. They are poverty-promoting because of their impact on child health and development, pregnancy, and worker productivity, as well as their stigmatizing features. The major NTDs that are within the scope of PLOS Neglected Tropical Diseases can be found in the description of the journal's scope.

Original Research Papers

All aspects of the NTDs will be considered, including their pathogenesis, clinical features, pharmacology and treatment, diagnosis, epidemiology, vector biology, and vaccinology and prevention. Demographic, ecological and social determinants, public health, and policy aspects of these diseases (including cost-effectiveness analyses) will also be a priority. PLOS Neglected Tropical Diseases is pleased to publish relevant *in vitro* and animal studies as well as human investigations. The journal is organized to provide additional support for authors from endemic countries, and such authors are particularly encouraged to submit their research to PLOS Neglected Tropical Diseases. Academic editors, supported by expert peer-reviewers, will select for publication those studies that drive their respective fields forward. We encourage papers that cross disciplines. If your study addresses an infection that is outside our detailed scope, you must first send a pre-submission inquiry indicating why you consider the infection to be a neglected tropical disease.

Magazine Section

In addition to publishing original research papers, PLOS Neglected Tropical Diseases will have an engaging magazine section with dedicated editors. Articles in the magazine section will mostly be commissioned, but we welcome your ideas for articles. If you would like to write a magazine-section article, please send a brief article proposal (up to 150 words) to [plosntds \[at\] plos.org](mailto:plosntds@plos.org).

2. Open Access

PLOS applies the Creative Commons Attribution (CC BY) license to all works we publish. Under the CC BY license, authors retain ownership of the copyright for their article, but authors allow anyone to download, reuse, reprint, modify, distribute, and/or copy articles in PLOS journals, so long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.

3. Publication Charges

To provide open access, PLOS journals use a business model in which our expenses—including those of peer review, journal production, and online hosting and archiving—are recovered in part by charging a publication fee to the authors or research sponsors for each article they publish. The fees vary by journal.

PLOS is committed to the widest possible global participation in open access publishing. To determine the appropriate fee, we use a country-based pricing model, which is based on the country that provides 50% or more of the primary funding for the research that is being submitted. Research articles funded by Upper Middle and High Income Countries incur our standard publication fees. Corresponding authors who are affiliated with one of our Institutional Members are eligible for a discount on this fee. Such authors will be informed of the discount applicable after submission of their manuscript.

Fees for Low and Lower Middle Income Countries are calculated according to the PLOS Global Participation Initiative pricing program for manuscripts submitted after 9am Pacific Time on September 4, 2012 (this program is not retroactive).

Group One: Countries from this list will not be charged for publishing

Group Two: Countries from this list will be charged a flat \$500

Our fee waiver policy, whereby PLOS offers to waive or further reduce the payment required of authors who cannot pay the full amount charged for publication, remains in effect. Editors and reviewers have no access to whether authors are able to pay; decisions to publish are only based on editorial criteria.

4. Criteria for Publication

Manuscripts should represent a substantial advance in medical science or medical practice in terms of:

Originality

Importance and relevance to researchers, practitioners, or policy makers in the field of NTDs

Interest for researchers or practitioners outside the field

Rigorous methodology with conclusions justified by the evidence presented

Adherence to the highest ethical standards

5. Presubmission Inquiries

We strongly encourage authors to send a presubmission inquiry before making a full submission. To see if a manuscript is appropriate for full submission, please login or register at <http://www.editorialmanager.com/pntd>, click the link labeled, "Submit New Manuscript"

and select Presubmission Inquiry as your article type. You will be asked for a cover letter explaining why you feel that the work is appropriate for PLOS Neglected Tropical Diseases, along with a referenced abstract of the paper (fewer than 500 words) that describes the background, aims and methodology, key results, and major conclusions of the work. We aim to provide responses to these inquiries within 48 hours. Authors who receive an invitation to submit their manuscripts will then enter the regular editorial process.

6. Overview of Editorial Process

Our aim is to provide all authors with an efficient, courteous, and constructive editorial process. To ensure the fairest and most objective decision-making, the editorial process is run as a partnership between the PLOS Neglected Tropical Diseases Editors-in-Chief, the board of Deputy Editors, and a team of academic experts who act as Associate Editors (AEs). These individuals, all of whom are members of the PLOS Neglected Tropical Diseases Editorial Board, are leaders in their fields and represent the full breadth of research on NTDs.

Submitted manuscripts are assigned to a Deputy Editor, who then assigns it to an appropriate AE. The AE promptly evaluates the paper and decides whether it is likely to meet the requirements of providing enough of an advance in a particular field and describing a sufficient body of work to support that claim. If so, the paper is sent out for peer review.

Expert reviewers will be asked to assess the technical and scientific merits of the work. Where relevant, work presented in a manuscript will be subject to a rigorous review of the statistical methods used. As a default, reviewer's names are not included along with their comments to authors, but PLOS Neglected Tropical Diseases does encourage open (non-anonymous) peer-review.

Upon submission of a manuscript, authors are asked if they wish to exclude any specific academic editors or reviewers from the peer review of their article. The editorial team will respect these requests so long as this does not interfere with the objective and thorough assessment of the article. See the relevant guidelines for reviewers and more general information on PLOS' policy regarding competing interests.

Once all reviews have been received and considered by the professional and academic editors, a decision letter to the author will be drafted.

There are several types of decision possible:

Accept without revision

Minor revision

Major revision

Reject, typically because the paper does not meet the criteria for publication outlined above

Revised manuscripts will be assessed by the same academic editor. Sometimes, re-review or additional statistical review will be required, but in general we aim to make decisions without involving multiple rounds of review.

Upon acceptance, the manuscript is checked by PLOS staff to ensure that it is in a format that can be efficiently handled by our production system. The authors will be queried and allowed to make any final minor revisions that are needed.

This is the final stage at which authors will see their manuscript before publication. The authors' files will be carefully tagged to generate XML and PDF files, but will not be subject to detailed copyediting (see Overview of the Production Process). It is therefore essential that authors provide a thoroughly proofread and checked manuscript, following the manuscript checklist and any comments from PLOS staff.

Appeals of Decisions

PLOS Neglected Tropical Diseases encourages input from the community regarding editorial and publishing policies. However, appeals against manuscript decisions must be a) limited to the specific manuscript in question, b) made only by the corresponding author, and c) sent by e-mail to plosntds [at] plos.org. Telephone calls or other informal appeals are discouraged and will not be considered. Appeals will only be considered when a reviewer or editor is thought to have made a significant factual error or when his/her objectivity is compromised by a documented competing interest, and when a reversal based on either of these grounds would change the original decision. The journal staff will ask for confirmation of the reason(s) in the first instance. If the authors proceed, the original editor(s) will usually be asked to consider the appeal. Additional editorial board members may also be consulted. Each appeal is treated on its merits, and the journal cannot make any guarantees about the turnaround time or outcome.

7. Supporting Information and Materials Required at Submission

PLOS Neglected Tropical Diseases is committed to the highest ethical standards in medical research. Accordingly, we ask authors to provide specific information regarding ethical treatment of research participants, patient consent, patient privacy, protocols, authorship, and competing interests. We also ask that reports of certain specific types of studies adhere to generally accepted standards. Our requirements are based on the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, issued by the International Committee for Medical Journal Editors and are enumerated below. See the Supporting Information Guidelines for more details about our requirements for supporting information and multimedia files.

Human and Animal Research

All research involving humans and animals must have been approved by the authors' institutional review board or equivalent committee(s), and that board must be named by the authors in the manuscript. For research involving human participants, informed consent must have been obtained (or the reason for lack of consent explained, e.g. the data were analyzed anonymously) and all clinical investigation must have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. It must be stated in the Methods section of the paper whether informed consent was written or oral. If informed consent was oral, it must be stated in the paper: (a) why written consent could not be obtained, (b) that the IRB approved the use of oral consent, and (c) how oral consent was documented.

Authors should be able to submit, upon request, a statement from the research ethics committee or institutional review board indicating approval of the research. We also encourage authors to submit a sample of a patient consent form, and may require submission on particular occasions.

All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. In accordance with the recommendations of the Weatherall report, "The use of non-human primates in research" we specifically require authors to include details of animal welfare and steps taken to ameliorate suffering in all work involving non-human primates. The institution that approved the study must be named, and it must be stated in the paper that the study was conducted adhering to the institution's guidelines for animal husbandry.

Patient Privacy and Informed Consent for Publication

Our human participant policy conforms to the Uniform Requirements of the International Committee of Medical Journal Editors:

"Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying information should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that the patient be shown the manuscript to be published.

Complete anonymity is difficult to achieve, and informed consent for publication should be obtained if there is any doubt. If data are changed to protect anonymity, authors should provide assurance that alterations of the data do not distort scientific meaning.

When informed consent has been obtained it should be indicated in the published article."

For papers that include identifying information, or potentially identifying information, authors must download the Consent Form for Publication in a PLOS Journal from our site, which the

patient, parent or guardian must sign once they have read the paper and been informed about the terms of PLOS open-access license. (This license means that the images and text we publish online become available for any lawful purpose). Once authors have obtained the signed consent form, it should be filed securely in the patient's case notes and the article submitted to PLOS journal should include this statement indicating that specific consent to publication was obtained. "The patients in this manuscript have given written informed consent (as outlined in PLOS consent form) to publication of their case details."

Download "Consent Form for Publication":

English

French

Portuguese

Spanish

Material Required for the Submission of Specific Study Types

a. Clinical Trials

We follow the WHO definition of a clinical trial. "A clinical trial is any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes. Interventions include but are not restricted to drugs, cells and other biological products, surgical procedures, radiologic procedures, devices, behavioural treatments, process-of-care changes, preventive care, etc"

PLOS supports the position of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trial registration. All trials initiated after 1 July 2005 must be registered prospectively in a publicly accessible registry (i.e., before patient recruitment has begun), or they will not be considered for publication. For trials initiated before 1 July 2005, all trials must be registered before submission to our journals. See the ICMJE faq on trial registration for further details. The WHO's list of approved registries is listed here <http://www.who.int/ictrp/network/primary/en/index.html>.

Authors of trials must adhere to the CONSORT reporting guidelines appropriate to their trial design. Please check the CONSORT statement Web site for information on the appropriate guidelines for specific trial types. Before the paper can enter peer review authors must: 1) name in the paper trial registry, trial registration number, and IRB and 2) provide a copy of the trial protocol and a completed CONSORT checklist as supporting files (these documents will also be published alongside the paper, if accepted). The CONSORT flow diagram must be included as Figure 1. Any deviation from the trial protocol must be explained in the paper. Authors must explicitly discuss informed consent in their paper, and PLOS reserves the right

to ask for a copy of the patient consent form. Information on statistical methods or participants beyond what is indicated in the CONSORT statement should be reported in the Methods section.

b. Systematic Reviews and Meta-Analyses

Reports of systematic reviews and meta-analyses should use the PRISMA statement as a guide, and include a completed PRISMA checklist and flow diagram to accompany the main text. Blank templates of the checklist and flow diagram can be downloaded from the PRISMA Web site.

c. Diagnostic Studies

Reports of studies of diagnostic accuracy should conform to the STARD requirements.

d. Epidemiological Studies

For reports of epidemiological studies, you should consult the STROBE initiative.

e. Microarray Experiments

Reports of microarray experiments should conform to the MIAME guidelines, and the data from the experiments must be deposited in a publicly accessible database.

Author Status

All authors will be contacted via e-mail at submission to ensure that they are aware of and approve the submission of the manuscript, its content, authorship, and order of authorship. Articles will not be published unless all authors have provided their assent to publication.

The involvement of any professional medical writer in publication must be declared. We encourage authors to consult the European Medical Writers' Association Guidelines on the role of medical writers. For all PLOS journals, the corresponding author must submit the manuscript, related files, and all required data and information. From the point of submission through to publication, all communication related to that manuscript will be directed to and received from the corresponding author only.

PLOS Neglected Tropical Diseases bases its criteria for authorship on those outlined in the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals, which are summarized below. The contributions of all authors must be described. Contributions that fall short of authorship should be mentioned in the acknowledgements.

"Authorship credit should be based on

1) substantial contribution to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data;

- 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and
- 3) final approval of the version to be published.

Authors should meet conditions 1, 2, and 3.

When a large, multi-center group has conducted the work, the group should identify the individuals who accept direct responsibility for the manuscript (3). These individuals should fully meet the criteria for authorship defined above and editors will ask these individuals to complete journal-specific author and competing interests disclosure forms. When submitting a group author manuscript, the corresponding author should clearly indicate the preferred citation and should clearly identify all individual authors as well as the group name.

Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship. All persons designated as authors should qualify for authorship, and all those who qualify should be listed. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content."

PLOS journals follow the COPE guidelines covering changes in authorship. Please note that if any changes to the list of authors of a manuscript are necessary after the initial submission of a manuscript to a PLOS journal but before its publication, the corresponding author may be asked to provide written confirmation that all authors consent to the change(s). The journal also reserves the right to request written confirmation from all authors (including those added, removed, or moved in the author order). Such written consent may be required before the revised submission is sent to the editors.

Prior Publication

When submitting an article, all authors are asked to indicate that they have not submitted a similar manuscript for publication elsewhere. If related work has been submitted elsewhere, then a copy must be included with the article submitted to PLOS. Reviewers will be asked to comment on the overlap between related submissions.

8. Preparation of Research Articles

PLOS Neglected Tropical Diseases publishes original research articles of importance to the NTDs community and the wider health community. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a more limited range of experiments.

The writing style should be concise and accessible, avoiding jargon so that the paper is understandable for readers outside a specialty or those whose first language is not English. Editors will make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or

additions that could be made to the article to strengthen the argument. Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, but not intrusive or overbearing. Authors are encouraged to use their own voice and to decide how best to present their ideas, results, and conclusions. Although we encourage submissions from around the globe, we require that manuscripts be submitted in English. Authors who do not use English as a first language may contact us for additional information. As a step towards overcoming language barriers on acceptance of the paper, we encourage authors fluent in other languages to provide copies of their full articles or abstracts in other languages. We will publish these translations as supporting information and list them, together with other supporting information files, at the end of the article text.

Cover Letter

Please include a cover letter explaining why this manuscript is suitable for publication in PLOS Neglected Tropical Diseases. Why will your research paper inspire the NTDs community, and how will it drive the understanding of NTD pathobiology, epidemiology, prevention, treatment, control, or policy?

If your study addresses an infection that is outside our detailed scope, you must first send a pre-submission inquiry indicating why you consider the infection to be a neglected tropical disease.

Electronic Formats

Our submission system supports a limited range of formats for text and graphics. The following file formats/types and manuscript information are required before submission. If you are concerned about the suitability of your files, please contact us at [plosntds \[at\] plos.org](mailto:plosntds@plos.org).

Manuscript and Table Files

Articles can be submitted for review in DOC, DOCX, RTF, or PDF. Any articles that have been prepared in LaTeX will be accepted for review, but only in PDF format. After acceptance, only text files (RTF or DOC) of the revised manuscript and tables can be accepted for use in the production process.

Math Equations and DOCX

If your manuscript is or will be in DOCX and contains equations, you must follow the instructions below to make sure that your equations are editable when the file enters production.

If you have not yet composed your article, you can ensure that the equations in your DOCX file remain editable in DOC by enabling “Compatibility Mode” before you begin. To do this,

open a new document and save as Word 97-2003 (*.doc). Several features of Word 2007/10 will now be inactive, including the built-in equation editing tool. You can insert equations in one of the two ways listed below.

If you have already composed your article as DOCX and used its built-in equation editing tool, your equations will become images when the file is saved down to DOC. To resolve this problem, re-key your equations in one of the two following ways.

Use MathType to create the equation. MathType is the recommended method for creating equations.

Go to Insert > Object > Microsoft Equation 3.0 and create the equation.

If, when saving your final document, you see a message saying “Equations will be converted to images,” your equations are no longer editable and PLOS will not be able to accept your file.

LaTeX

Articles prepared in LaTeX may be submitted in PDF format for use during the review process. After acceptance, however, .tex files and formatting information will be required as a zipped file. Please consult our LaTeX Guidelines for a list of what will be required.

Tables

Tables must conform to our Guidelines for Figure and Table Preparation and placed at the end of the article DOC or RTF file. Accepted LaTeX submissions only should have table files—which must also conform to these guidelines—uploaded individually into the online submission system.

Figure Files

Graphics files can only be submitted in EPS or TIF format. For the article to be accepted for publication, the author will need to supply high-resolution versions of the figures. When preparing your figures, please ensure that the files conform to our Guidelines for Table and Figure Preparation.

If you are uploading your files in EPS format, please use the "create outlines" option under the type menu in Illustrator so that all text and fonts appear as intended in print. If you need additional help with figure preparation, please contact figures [at] plos.org.

Authors are encouraged to provide a striking image to accompany their article, if one is available. This image may be chosen to highlight the article on our journal Web site.

PLOS does not accept vector EPS figures generated using LaTeX. We only accept LaTeX generated figures in TIFF format. Export your LaTeX files as PDFs, and then open them in

GIMP or Photoshop and save as TIFF. In general, Figures must be generated in a standalone graphics application such as Adobe Illustrator, InkScape, PyMol, MatLab, SAS, etc. Please see our Figure Guidelines for more information.

PLOS applies the Creative Commons Attribution (CC BY) license to all figures we publish, which allows them to be freely used, distributed, and built upon as long as proper attribution is given. Please do not submit any figures that have been previously copyrighted unless you have express written permission from the copyright holder to publish under the CC BY license.

Financial Disclosure

This section should describe sources of funding that have supported the work. Please include relevant grant numbers and the URL of any funder's Web site. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders, and amend the aforementioned sentence as needed.

Competing Interests

The submitting author is asked at submission to declare, on behalf of all authors, whether there are any financial, personal, or professional interests that could be construed to have influenced the paper. The information entered here will appear in the published version, so please do not include the same in the manuscript file.

Reviewers are also asked to declare any interests that might interfere with their objective assessment of a manuscript. Any relevant competing interests of authors must be available to editors and reviewers during the review process and will be stated in published articles. Read more about PLOS's Competing Interests Policy.

Abbreviations

Please keep abbreviations to a minimum and define them upon first use in the text. Non-standard abbreviations should not be used unless they appear at least three times in the text.

Nomenclature

The use of standardized nomenclature in all fields of science and medicine is an essential step toward the integration and linking of scientific information reported in published literature.

We will enforce the use of correct and established nomenclature wherever possible:

We strongly encourage the use of SI units. If you do not use these exclusively, please provide the SI value in parentheses after each value.

Species names should be italicized (e.g., *Homo sapiens*) and the full genus and species must be written out in full, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper; after that, the first letter of the genus name, followed by the full species name may be used.

Genes, mutations, genotypes, and alleles should be indicated in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database, e.g., HUGO for human genes. It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman: v-fes, c-MYC, etc.

The Recommended International Non-Proprietary Name (rINN) of drugs should be provided.

Accession Numbers

All appropriate datasets, images, and information should be deposited in public resources.

Please provide the relevant accession numbers (and version numbers, if appropriate).

Accession numbers should be provided in parentheses after the entity on first use. Suggested databases include, but are not limited to:

ArrayExpress

BioModels Database

Database of Interacting Proteins

DNA Data Bank of Japan [DDBJ]

DRYAD

EMBL Nucleotide Sequence Database

GenBank

Gene Expression Omnibus [GEO]

Protein Data Bank

UniProtKB/Swiss-Prot

ClinicalTrials.gov

In addition, as much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

Ensembl

Entrez Gene

FlyBase

InterPro

Mouse Genome Database (MGD)

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)

PubChem

Providing accession numbers allows linking to and from established databases and integrates your article with a broader collection of scientific information.

Organization of the Manuscript

Most articles published in PLOS Neglected Tropical Diseases are organized into the following sections: Title, Authors and Affiliations, Abstract, Author Summary, Introduction, Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, References, Figure Legends, and Tables. Uniformity in format facilitates the experience of readers and users of the journal. To provide flexibility, however, the Results and Discussion can be combined into one Results/Discussion section. All manuscripts must contain line numbers. Although we have no firm length restrictions for the entire manuscript, we urge authors to present and discuss their findings concisely.

Title (150 characters)

The title should be specific to the study yet concise, and should allow sensitive and specific electronic retrieval of the article. It should be comprehensible to readers outside your field. Avoid specialist abbreviations if possible. Titles should be presented in title case, meaning that all words except for prepositions, articles, and conjunctions should be capitalized. If the paper is a randomized controlled trial or a meta-analysis, this description should be in the title.

Examples:

Climate Change and Spread of Lymphatic Filariasis in Sub-Saharan Africa

A Cluster-Randomized Controlled Trial of a Nurse-Led Deworming Program for Soil-Transmitted Helminths

Please also provide a brief Short Title of no more than 50 characters (including spaces).

Authors and Affiliations

Provide the first names or initials (if used), middle names or initials (if used), surnames, and affiliations—department, university or organization, city, state/province (if applicable), and country—for all authors. One of the authors should be designated as the corresponding author. It is the corresponding author's responsibility to ensure that the author list, and the

summary of the author contributions to the study are accurate and complete. If the article has been submitted on behalf of a consortium, all consortium members and affiliations should be listed after the Acknowledgments.

(For authorship criteria, see Supporting Information and Materials Required at Submission)

Abstract

The abstract succinctly introduces the paper. We advise that it should not exceed 250 – 300 words. It should mention the techniques used without going into methodological detail and summarize the most important results with important numerical results given. The abstract is conceptually divided into the following three sections with these headings: Background, Methodology/Principal Findings, and Conclusions/Significance. Please do not include any citations in the abstract. Avoid specialist abbreviations.

Author Summary

We ask that all authors of research articles include a 150- to 200-word non-technical summary of the work, immediately following the Abstract. Subject to editorial review and author revision, this short text is published with all research articles as a highlighted text box.

Distinct from the scientific abstract, the author summary should highlight where the work fits in a broader context of life science knowledge and why these findings are important to an audience that includes both scientists and non-scientists. Ideally aimed to a level of understanding of an undergraduate student, the significance of the work should be presented simply, objectively, and without exaggeration.

Authors should avoid the use of acronyms and complex scientific terms and write the author summary using the first-person voice. Authors may benefit from consulting with a science writer or press officer to ensure that they effectively communicate their findings to a general audience.

Examples are available at:

Pseudogenization of a Sweet-Receptor Gene Accounts for Cats' Indifference toward Sugar

A Hybrid Photoreceptor Expressing Both Rod and Cone Genes in a Mouse Model of Enhanced S-Cone Syndrome

Life in Hot Carbon Monoxide: The Complete Genome Sequence of *Carboxydothemus hydrogeniformans* Z-2901

Introduction

The introduction should discuss the purpose of the study in the broader context. As you compose the introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief

review of the key literature. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about whether that aim was achieved.

Methods

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be referenced. Detailed methodology or supporting information relevant to the methodology can be published on our Web site.

This section should also include a section with descriptions of any statistical methods employed. These should conform to the criteria outlined by the Uniform Requirements, as follows: "Describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals). Avoid relying solely on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, which fails to convey important quantitative information. Discuss the eligibility of research participants. Give details about randomization. Describe the methods for and success of any blinding of observations. Report complications of treatment. Give numbers of observations. Report losses to observation (such as dropouts from a clinical trial). References for the design of the study and statistical methods should be to standard works when possible (with pages stated) rather than to papers in which the designs or methods were originally reported. Specify any general-use computer programs used."

Results

The results section should include all relevant positive and negative findings. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. Large datasets, including raw data, should be submitted as supporting files; these are published online alongside the accepted article. The results section should be written in past tense.

As outlined in the Uniform requirements, authors that present statistical data in the Results section, should "...specify the statistical methods used to analyze them. Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess its support. Use graphs as an alternative to tables with many entries; do not duplicate data in graphs and tables. Avoid nontechnical uses of technical terms in statistics, such as "random" (which implies a randomizing device), "normal," "significant," "correlations," and "sample." Define statistical terms, abbreviations, and most symbols."

Discussion

The discussion should be concise and tightly argued. It should start with a brief summary of the main findings. It should include paragraphs on the generalisability, clinical relevance, strengths, and, most importantly, the limitations of your study. You may wish to discuss the following points also. How do the conclusions affect the existing knowledge in the field? How can future research build on these observations? What are the key experiments that must be done?

Acknowledgments

People who contributed to the work, but do not fit the criteria for authors should be listed in the Acknowledgments, along with their contributions. You must also ensure that anyone named in the acknowledgments agrees to being so named.

Details of the funding sources that have supported the work should be confined to the funding statement provided in the online submission system. Do not include them in the acknowledgments.

References

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Papers that have been submitted but not yet accepted should not be cited. Limited citation of unpublished work should be included in the body of the text only as “unpublished data.” All “personal communications” citations should be supported by a letter from the relevant authors.

Style information:

PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first five authors, et al.

References are listed and numbered in the order that they appear in the text.

In the text, citations should be indicated by the reference number in brackets.

The parts of the manuscript should be in the correct order before ordering the citations: body, boxes, figure captions, tables, and supporting information captions.

Abstracts and author summaries may not contain citations.

Journal name abbreviations should be those found in the NCBI databases:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>.

Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of the references is crucial. For convenience, a number of reference software companies supply PLOS style files (e.g., Reference Manager, EndNote).

Published Papers

1. Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, et al. (2011) cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Genet Mol Res* 10: 1576-1588.

Note: Use of a DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers.

Accepted, unpublished papers

Same as above, but “In press” appears instead of the page numbers.

Electronic Journal Articles

1. Huynen MMTE, Martens P, Hilderink HBM (2005) The health impacts of globalisation: a conceptual framework. *Global Health* 1: 14. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>. Accessed 25 January 2012.

Books

1. Bates B (1992) *Bargaining for life: A social history of tuberculosis*. Philadelphia: University of Pennsylvania Press. 435 p.

Book Chapters

1. Hansen B (1991) New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. *AIDS and the historian*. Bethesda: National Institutes of Health. pp. 21-28.

Figure Legends

The aim of the figure legend should be to describe the key messages of the figure, but the figure should also be discussed in the text. An enlarged version of the figure and its full legend will often be viewed in a separate window online, and it should be possible for a reader to understand the figure without switching back and forth between this window and the relevant parts of the text. Each legend should have a concise title of no more than 15 words that can stand alone, without the use of figure part labels. The overall legend itself should be succinct, while still explaining all figure parts, symbols, and abbreviations. Avoid lengthy descriptions of methods.

Tables

All tables should have a concise title. Footnotes can be used to explain abbreviations. Citations should be indicated using the same style as outlined above. Tables should not occupy more than one printed page; larger tables can be published as online supporting information. Tables must be cell-based; do not use picture elements, text boxes, tabs, or returns in tables. Please ensure that the files conform to our Guidelines for Figure and Table Preparation when preparing your tables for production.

Tables should be placed at the end of the manuscript file, rather than uploaded separately into the submission system.

Multimedia Files and Supporting Information

We encourage authors to submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All supporting material will be subject to peer review, and should be smaller than 10 MB in size because of the difficulties that some users will experience in loading or downloading files of a greater size.

Supporting files should fall into one of the following categories: Dataset, Figure, Table, Text, Protocol, Audio, or Video. All supporting information should be referred to in the manuscript with a leading capital S (e.g., Figure S4 for the fourth supporting information figure). The numbered title and caption for each supporting information file should be included in the main article file, after the titles and captions for the main figures.

Supporting files may be submitted in a variety of formats, but should be publication-ready, as these files are not copyedited. Carefully consider whether your supporting information needs to be searchable and/or editable, and choose the most suitable format accordingly. See the Supporting Information Guidelines for more details about our requirements for supporting information and multimedia files.

9. Submission of Research Manuscripts

Are You Ready to Submit Your Manuscript?

We have provided an author checklist to help you prepare your materials for submission and to make the online submission process as straightforward as possible. Please take the time to look through the list before submitting your article.

If you are submitting a revised manuscript, you will have been given substantial guidance by the editors. We have provided a checklist for revised manuscripts.

Electronic Submission

Detailed instructions for submission can be found on the PLOS Neglected Tropical Diseases Manuscript Submission and Peer Review Web site. Files are uploaded individually and are combined into a single PDF file, which must be approved by the author at the end of the submission process.

Text files can be submitted in DOC or RTF format. Please convert LaTeX files to one of the acceptable formats.

Graphics files can only be submitted in EPS or TIF format. If possible, please label all figures with a standard font such as Arial or Times New Roman. Please read the Guidelines for Figure Preparation before submitting figures.

10. Other Types of Articles

Articles for the Magazine Section

In addition to publishing original research papers, PLOS Neglected Tropical Diseases will have an engaging magazine section with dedicated editors. Articles in the magazine section will mostly be commissioned, but we welcome your ideas for articles. If you would like to write a magazine-section article, please submit a presubmission inquiry or a full submission. If you wish to submit a full submission, please note that you must submit your manuscript as a "Research Article" - please kindly make a note in the "Comments" box of your submission form and we will change the article categorization for you.

Word counts for magazine-section articles are given in the descriptions below. Very long documents can be hosted as supplementary files (Supporting Information) with the magazine-section articles.

Editorial

These 600- to 800-word articles are written in-house by the Editor-in-Chief or a member of the Editorial Board.

Viewpoints

Viewpoints are opinion pieces grounded in evidence. The word limit is 1,500 words. Authors are encouraged to cite up to 15 references in support of their key assertions, and to use a logical structure for their piece. We encourage all authors to include a display item (a figure, photo, or illustration), which will be published under the Creative Commons Attribution License. Please see Guidelines for Table and Figure Preparation.

Debate

The Debate highlights topical, emerging, or controversial issues in the NTDs field, such as controversies about the best treatment or prevention approach. Debates will be commissioned from two or more authors with differing points of view. Each author has up to 800 words and 10 references to outline their initial viewpoint, and then 400 words and 5 references to respond to the opposing viewpoint. We encourage each author to include a display item (a figure, photo, or illustration), which will be published under the Creative Commons Attribution License. Please see Guidelines for Table and Figure Preparation.

Policy Platform

These articles provide a platform to discuss specific policies that could improve the lives of those at risk of, or affected by, the NTDs. New and specific policy proposals that arise from high-level national or international meetings will be considered for this section, but we will not publish traditional "meeting reports." These articles are usually 2,000 words, with up to 25 references. In very exceptional circumstances (i.e., when the article is of particular public-health importance), we will give authors a higher word limit, but this must be negotiated with the editors ahead of writing the article. We encourage all authors to include 3-5 display items (figures, photos, illustrations), which will be published under the Creative Commons Attribution License. Please see Guidelines for Table and Figure Preparation.

Review

In these articles, the author reviews the best available evidence on a topic relevant to the NTDs community. Authors must include a short abstract and a brief "Methods" section that tells readers how they searched and appraised the literature in preparing the review. The word limit is 3,000 words, with 50-80 references. In very exceptional circumstances (i.e., when the article is of particular public-health importance), we will give authors a higher word limit, but this must be negotiated with the editors ahead of writing the article. Authors must include two boxes:

A box that lists the 3-5 key learning points in their review

A box that lists the 5 key papers in the field

We encourage all authors to include 3-5 display items (figures, tables, photos, or illustrations), which will be published under the Creative Commons Attribution License. Please see Guidelines for Table and Figure Preparation.

Expert Commentary

In this article, we commission an expert to comment on a Research Article published in PLOS Neglected Tropical Diseases. The author will usually be the Academic Editor who oversaw the peer review of the Research Article, or one of the peer reviewers. The word limit is 1,000 words, with up to 15 references. We may also commission expert commentaries on research papers in other journals, provided that these papers are freely available online. We encourage all authors to include a display item (a figure, photo, or illustration), which will be published under the Creative Commons Attribution License. Please see Guidelines for Table and Figure Preparation.

From Innovation to Application

These short articles (1,000 words, 10 references) discuss new technologies, such as drugs, vaccines, and diagnostics, relevant to NTDs. Authors are asked to take an objective and

critical view, and they should include a box that lists up to 3 advantages and 3 disadvantages of the new technology. We will ask for a second box or table depending on what kind of tool is described (for example, if the tool is a new diagnostic tool, we will ask for a table that gives the sensitivity and specificity of the new tool compared with the existing gold standard). Authors with competing interests related to the technology (e.g., financial ties) will not be allowed to write for this section. We encourage all authors to include a display item (a figure, photo, or illustration), which will be published under the Creative Commons Attribution License. Please see Guidelines for Table and Figure Preparation.

Photo Quiz

These articles provide question-and-answer challenges that illustrate a key clinical issue in the diagnosis, management, or prevention of a neglected tropical disease. Submissions should follow this format:

Case Discussion and Question

Initial brief presentation of a clinical case with key images that invite a diagnosis from the reader.

The question portion may state the history of the case and note the findings and the outcome, but it should not provide the diagnosis. The case presentation and question should be written in a single paragraph of no more than 150 words and should be accompanied by no more than 2 images/figures. Please see Guidelines for Table and Figure Preparation.

Similar to the Clinical Symposium manuscripts, authors must obtain written consent from the patient using our consent form (also available in French, Portuguese, and Spanish).

Answer/Discussion. The Answer section should give the diagnosis, followed by a discussion of the most relevant clinical issues (no more than 1,200 words).

Key Learning Points. Authors must include a box that lists 3-5 key learning points of the case, similar to other clinical sections of PLOS Neglected Tropical Diseases.

References. No more than 10 references.

Symposium

This section has four sub-types:

Laboratory Symposium

Clinical Symposium

Control Symposium

Social, Cultural, Economic Symposium

In each case, the article begins by presenting a short "real-world" problem or challenge, and then uses this problem as the basis for an educational piece of up to 2,000 words, with 25 references. Further details for each type of symposium are given below:

Laboratory Symposium

These are problem-based learning articles, up to 2,000 words long. They begin with a description of a "real-world" problem (not a hypothetical one), which will be in the form of a set of laboratory results (e.g., microscopy, hematology results, drug susceptibility tests, alternative diagnoses) that are interesting, illuminating, or unusual and that will appeal to the journal's wider audience. This is then followed by a tutorial in the form of a series of questions and answers that help readers make sense of, and learn from, this set of laboratory results. Authors must include a box that lists the 3-5 key learning points of the article. We cannot publish any data that would identify a patient unless we have the patient's written consent, using our consent form (also available in French, Portuguese, and Spanish). We encourage all authors to include 3-5 display items (figures, photos, illustrations), which will be published under the Creative Commons Attribution License. Please see Guidelines for Table and Figure Preparation.

Clinical Symposium

There are two types of article that we will publish in the Clinical Symposium section:

Case-based learning articles, up to 2,000 words long. These begin with a description of how the patient presented, under the heading "Description of Case." This is then followed by a tutorial in the form of clinical questions and answers interspersed with further details of the case. An example of how this type of article is structured is at <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0020229>. The title should succinctly describe the problem but should not reveal the diagnosis (e.g., "A 17-Year-Old with Gradual Onset Blindness" or "A 45-Year-Old Woman with Chronic Itching"). Authors must obtain written consent from the patient using our consent form (also available in French, Portuguese, and Spanish). Authors must include a box that lists the 3-5 key learning points of the article. We strongly recommend that authors include examples of the patient's investigations (e.g., imaging, electrocardiograms, a video of the patient's clinical signs), all of which will be published under the Creative Commons Attribution License.

Case reports, up to 1,000 words long. Case reports will not be commissioned. To inquire about submitting a case report, please e-mail [plosntds \[at\] plos.org](mailto:plosntds@plos.org). Authors must obtain written consent from the patient using our consent form (also available in French, Portuguese, and Spanish). We will publish only cases that contain a valuable lesson or clinical reminder, and authors must include a box that lists the 3-5 key learning points of the article. An example

of how case reports in PLOS Neglected Tropical Diseases should be structured is at <http://dx.doi.org/doi:10.1371/journal.pmed.0010015>. We strongly recommend that authors include examples of the patient's investigations (e.g., imaging, electrocardiograms, a video of the patient's clinical signs), all of which will be published under the Creative Commons Attribution License. Please see Guidelines for Table and Figure Preparation.

Control Symposium

These are problem-based learning articles, up to 2,000 words long. They begin with a description of a "real-world" disease control challenge (i.e., at the community level, not the individual level). This is then followed by a tutorial in the form of a series of questions and answers that help readers understand how to tackle this type of control problem. Authors must include a box that lists the 3-5 key learning points of the article. We cannot publish any data that would identify a patient unless we have the patient's written consent, using our consent form (also available in French, Portuguese, and Spanish). We encourage all authors to include 3-5 display items (figures, photos, illustrations), which will be published under the Creative Commons Attribution License. Please see Guidelines for Table and Figure Preparation.

Social, Cultural, Economic Symposium

These are problem-based learning articles, up to 2,000 words long. They begin with a description of a "real-world" scenario with social, cultural, or economic implications. Examples include: the case of a woman with lymphatic filariasis whose family is too afraid to touch her; an African community that declines to allow mass drug administration because of culturally based suspicions of "Western" medicine; the case of a man blinded by trachoma or onchocerciasis who can no longer provide for his family; or the case of a boy with chronic hookworm infection with chronic stunting and cognitive difficulties. The description of the scenario is then followed by a tutorial in the form of a series of questions and answers that help readers understand how to approach such social, cultural, and economic concerns. Authors must include a box that lists the 3-5 key learning points of the article. We cannot publish any data that would identify a patient unless we have the patient's written consent, using our consent form (also available in French, Portuguese, and Spanish). We encourage all authors to include 3-5 display items (figures, photos, illustrations), which will be published under the Creative Commons Attribution License. Please see Guidelines for Table and Figure Preparation.

Historical Profiles and Perspectives

These articles look back in history to discuss a notable figure or a control program that worked or failed. Articles should be up to 1,500 words, with 15 references. We encourage all authors to include a display item (figure, photo, illustration), which will be published under

the Creative Commons Attribution License. Please see Guidelines for Table and Figure Preparation.

Interviews

These articles are up to 1,000 words long, and the author interviews a person who has made an important contribution to the fight against NTDs. We encourage the author to include a photo of the interviewee, which will be published under the Creative Commons Attribution License.

11. Overview of the Production Process

Before formal acceptance, the manuscript will be checked by PLOS staff to ensure that it complies with all essential format requirements. The authors' files are then carefully tagged to generate XML and PDF files, but will not be subject to detailed copyediting.

Once an article has been accepted for publication, the manuscript files are transferred into our production system and will be published in PDF and HTML formats, with an XML download option. Articles will also be archived in PubMed Central.

12. Embargoes and the Media

Authors are of course at liberty to present and discuss their findings ahead of publication: at medical or scientific conferences, on preprint servers, and in blogs, wikis and other informal communication channels. We recommend, however, that authors not contact the media or respond to such contact unless an article has been accepted for publication and an embargo date has been established. Respect for press embargoes will help to ensure that your work is reported accurately in the popular media, and that the full peer-reviewed paper is freely available to any interested reader when the news item is published. If a journalist has covered a piece of work ahead of publication, this will not affect consideration of the work for publication. See also our embargo guidelines for journalists.