

**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Título: Caracterização fenotípica de células NK e NKT na infecção pelo HTLV-1**

**Aluna: Camila Farias Amorim**

**Orientador: Edgar M. Carvalho**

### **Resumo**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE CÉLULAS NK E NKT NA INFECÇÃO PELO HTLV-1. Objetivos:** A citotoxicidade desenvolvida por células T CD8<sup>+</sup> é considerada o principal mecanismo de defesa contra o vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1). Assim como as células T CD8<sup>+</sup>, as células NK e NKT também são capazes de desgranular com a liberação de mediadores citotóxicos, tais como perforinas e granzimas. As células NK também medeiam a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) contra as células infectadas, mas poucos estudos procuram compreender o papel das células NK e NKT na infecção pelo HTLV-1. O objetivo deste estudo foi avaliar a frequência de células NK, expressão de CD16, CD107a, NKG2D nessas células em portadores do HTLV-1, pacientes com mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) e controles saudáveis e correlacionar os achados com a carga proviral e desenvolvimento para a HAM/TSP. **Métodos:** A caracterização fenotípica de células NK foi avaliada por citometria de fluxo. **Resultados:** As frequências de células CD56<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> e CD56<sup>dim</sup> estão diminuídas nos pacientes com HAM/TSP. Especificamente, a frequência de células NK foi inversamente correlacionada com a carga proviral em portadores do HTLV-1 mas não em pacientes com HAM/TSP. A frequência das células CD56<sup>+</sup> e CD56<sup>dim</sup> expressando CD16 também está diminuída em pacientes com HAM/TSP. Frequência de células NK expressando CD107a e a intensidade da expressão desta molécula foi maior em indivíduos infectados com HTLV-1 em comparação aos controles saudáveis, mas não foram observadas diferenças entre os grupos de portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP. A expressão do receptor NKG2D não é alterada em células NK de pacientes HAM/TSP, mas sim em células T CD8<sup>+</sup>. A expressão de NKG2D está diretamente correlacionada com a expressão de CD107a. **Conclusões:** Os dados neste estudo indicam que a desgranulação de células NK e NKT, assim como expressão de receptores CD16 e NKG2D estão preservados. Contudo, a diminuição da frequência destas células desempenhando funções citotóxicas no sangue periférico de pacientes com HAM/TSP em combate ao vírus podem estar associadas com o aumento da carga proviral e progressão para a doença.

**Palavras-chave:** 1. HTLV-1; 2. Células NK; 3. Citotoxicidade celular; 4. Resposta imune inata

## **Abstract**

**PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF NK AND NKT CELLS IN HTLV-1 INFECTION.** **Aims:** The cytotoxic activities of CD8<sup>+</sup> T cells has been considered the main defender mechanism against the human T lymphotropic virus type I (HTLV-1). Like CD8<sup>+</sup> T cells, NK and NKT cells are able to perform a cytotoxic degranulation with production of cytotoxic mediators, such as perforins and granzymes. NK and NKT cells also develop mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) against infected cells, but few studies seek to understand the role of these cells in HTLV-1 infection. The aims of this study were to evaluate the frequency of NK cells, expression of CD16, CD107a and NKG2D in these cells in HTLV-1 carriers, patients with myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) and healthy subjects, and correlate the findings with the proviral load and development of HAM/TSP. **Methods:** Phenotypic characterization of NK cells was evaluated by flow cytometry. **Results:** The frequencies of CD56<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>, CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> and CD56dim were decreased in HAM/TSP patients. Specifically, the frequency of NK cells was inversely correlated with the proviral load only in the group of HTLV-1 carriers but not in HAM/TSP patients. The frequency of CD56<sup>+</sup> and CD56dim cells expressing CD16 was decreased in HAM/TSP patients. The frequency of NK cells expressing CD107a and the intensity of this molecule was increased in HTLV-1 infected subjects compared to healthy controls, but we did not observed differences between the groups of HTLV-1 carriers and HAM/TSP patients. The expression of NKG2D receptor is not altered in NK cells from HAM/TSP patients, but is in T CD8<sup>+</sup> lymphocytes. The expression of NKG2D was directly correlated with CD107a expression. **Conclusions:** The data presented in this study indicate that the degranulation of NK and NKT cells as well as the expression of the receptors CD16 and NKG2D are preserved. However, the decreased frequency of these cells performing cytotoxic functions in peripheral blood of HAM/TSP patients against infected cells might be associated with the increased proviral load and progression to disease.

**Keywords:** 1. HTLV-1; 2. NK cells; 3. Cellular cytotoxicity; 4. Innate immunity response

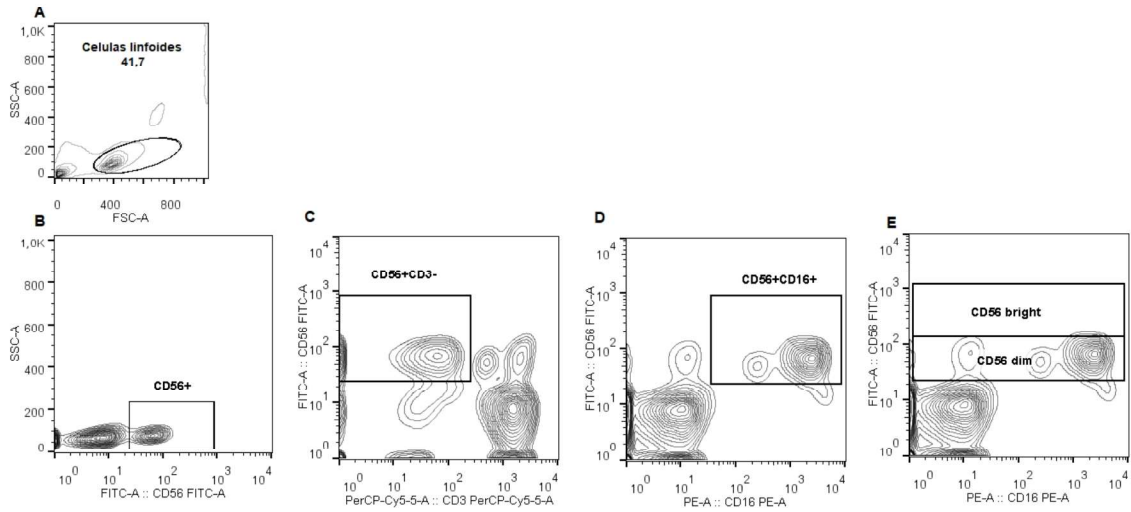
## Metadados

**Tabela 3. Dados demográficos, carga proviral e produção espontânea de IFN- $\gamma$  e TNF em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.**

	<b>Controles Sadios (n = 10)</b>	<b>Portadores do HTLV-1 (n = 20)</b>	<b>HAM/TSP (n = 19)</b>	<b>Valor <i>P</i></b>
Idade (anos)	30 (23-45)	52 (31-69)	63 (36-76)	<0.0001*
Gênero (M/F)	1/9	8/12	9/10	0.12**
Carga Proviral (cópias/10 <sup>6</sup> cels)	--	16.190 (110-292.916)	72.438 (20.000-365.075)	<0.0001***
IFN- $\gamma$ (pg/mL)	0 (0-13)	364 (46-1.429)	921 (9-1.897)	0.03*
TNF (pg/mL)	6 (0-120)	8 (0-192)	284 (34-1.805)	0.0002*

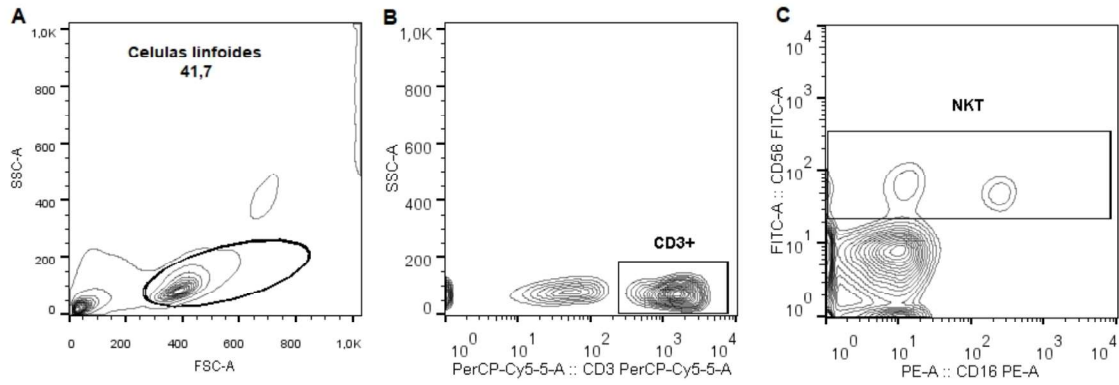
\* = Kruskal-Wallis; \*\* = Qui-quadrado ( $X^2$ ); \*\*\* = Mann-Whitney. Dados de idade, carga proviral, IFN- $\gamma$  e TNF são representados pela mediana (valores mínimos e máximos).

**Figura 6. Esquema dos *gates* representativos para caracterização de células NK por citometria de fluxo.**



Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram marcadas com anticorpos monoclonares anti-CD56, anti-CD3, anti-CD16 para avaliação das frequências de células NK por citometria de fluxo. As células linfóides foram selecionadas a partir de tamanho (SSC) e granulosidade (FSC) (A), para então células NK serem caracterizadas em células CD56+ (B), CD56+CD3- (C), CD56+CD16+ (D) e CD56dim e CD56bright (E).

**Figura 7. Esquema dos *gates* representativos para caracterização de células NKT por citometria de fluxo.**



Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram marcadas com anticorpos monoclonares anti-CD56, anti-CD3, anti-CD16 para avaliação das frequências de células NKT por citometria de fluxo. As células linfóides foram selecionadas a partir de tamanho (SSC) e granulosidade (FSC) (A), para as células CD3+ serem selecionadas+ (B), e então as células NKT (C).

**Tabela 4. Frequência de células NK e NKT em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.**

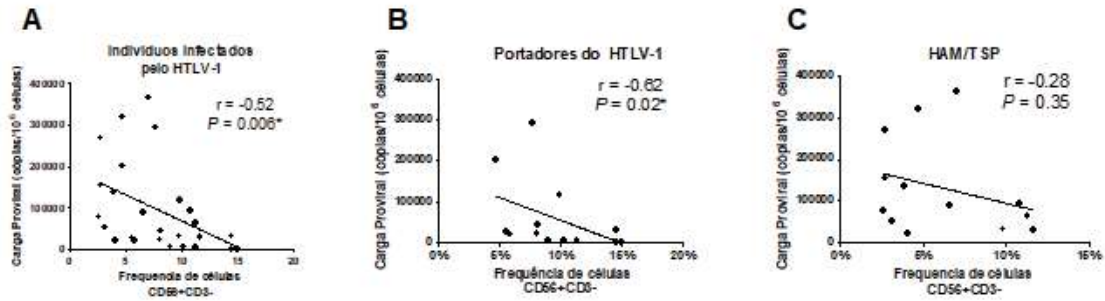
<b>Frequência de células (%)</b>	<b>Controles Sadios (n = 10)</b>	<b>Portadores do HTLV-1 (n = 20)</b>	<b>HAM/TSP (n = 19)</b>
CD56+	16,4 (11,6-23,8)	13,3 (6,4-26,4)	11,2 (4,6-19,4) <sup>a,b</sup>
CD56+CD3-	7,9 (4,5-15,3)	8,9 (2,8-15)	5,8 (1,9-11,7) <sup>a,b</sup>
CD56+CD16+	10,1 (5,3-16,2)	10,7 (3,2-22,9)	7,2 (1,8-15,8) <sup>a,b</sup>
CD56dim	12,9 (9-21,3)	12,2 (5-27,4)	9,5 (3,4-19,4) <sup>a,b</sup>
CD56bright	0,9 (0,5-3,4)	0,8 (0,07-1,5)	0,7 (0,2-1,3)
NKT	6,4 (3,5-11,5)	4,8 (2,2-14,7)	4,1 (1,9-9,7)

O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado nas análises estatísticas. Dados estão representados pela mediana (e valores mínimos e máximos).

<sup>a</sup>controles sadios x HAM/TSP ( $P < 0.05$ )

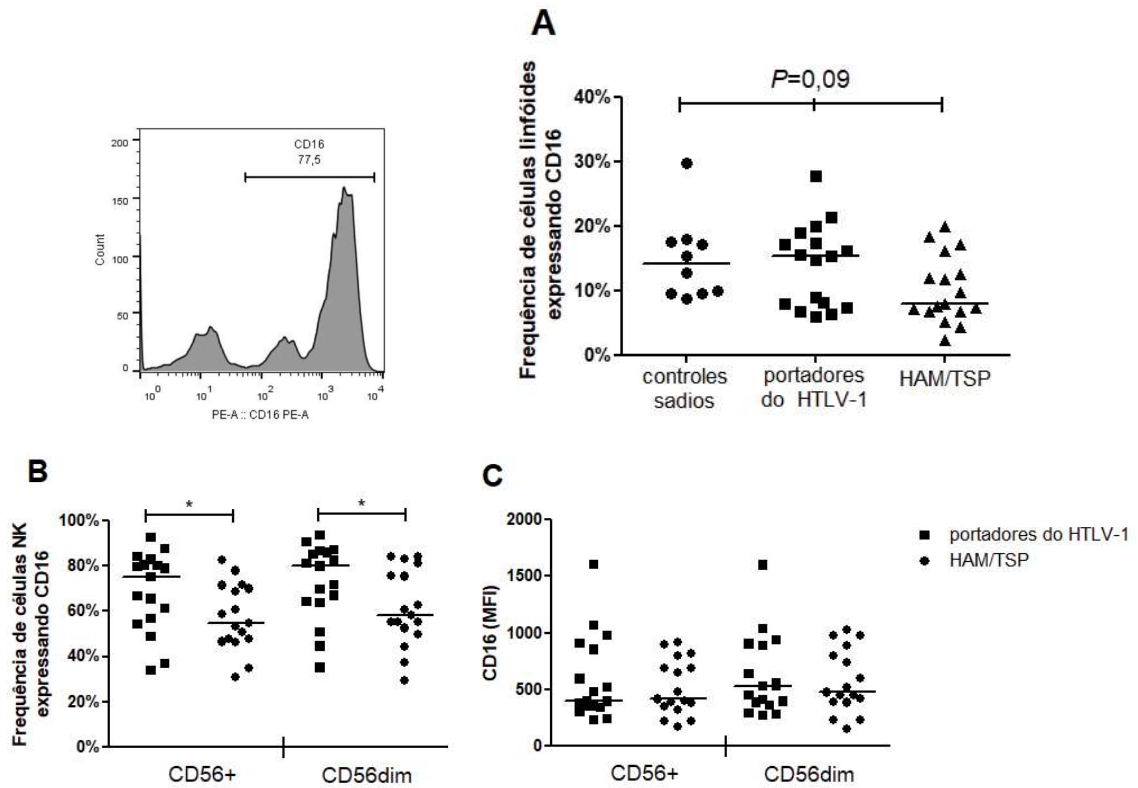
<sup>b</sup>portadores do HTLV-1 x HAM/TSP ( $P < 0.05$ )

**Figura 8. Correlação entre a carga proviral e a frequência de células NK em indivíduos infectados pelo HTLV-1.**



Correlação entre a carga proviral e a frequência de células CD56+CD3- em (A) indivíduos infectados pelo HTLV-1, e separadamente em (B) portadores do HTLV-1 e (C) pacientes com HAM/TSP. O teste não paramétrico r de Spearman foi utilizado nas análises estatísticas. \* $P < 0.05$ .

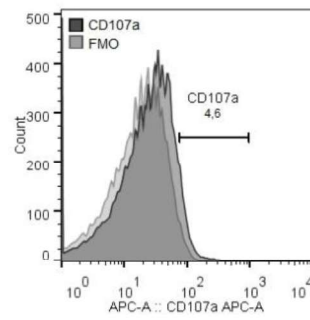
**Figura 9. Frequência de células linfóides e células NK (CD56+ e CD56dim) expressando CD16 em indivíduos infectados pelo HTLV-1.**



**(A)** Frequência de células linfóides e células **(B)** CD56+ **(C)** CD56dim expressando CD16 em controles sadios, portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP. O teste Mann-Whitney foi utilizado na análise estatística,  $*P<0.05$ . Na parte esquerda/acima do gráfico está representada a estratégia de seleção da expressão de CD16 por Fluorescência Menos Um/Fluorescence minus one” (FMO), utilizada para controle interno do experimento.



**Figura 10.** Estratégia de seleção para expressão de CD107a.



Estratégia de seleção da expressão de CD107a por Fluorescência Menos Um/“*Fluorescence minus one*” (FMO), utilizada para controle interno do experimento.

**Tabela 5. Frequência de células NK e NKT expressando CD107 e MFI da expressão de CD107a por células NK de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles saudios.**

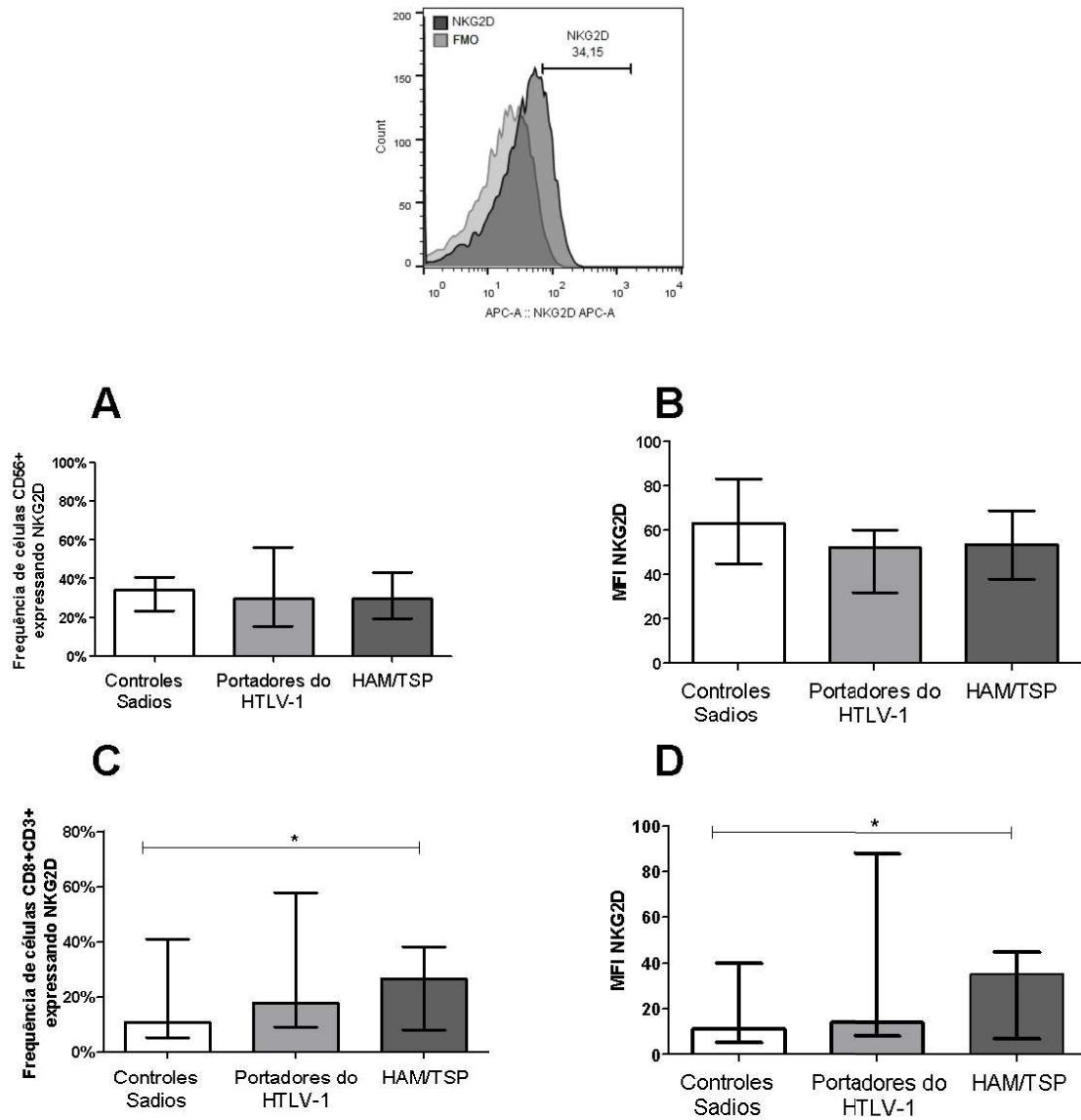
	<b>Controles Saudios (n = 10)</b>	<b>Portadores do HTLV-1 (n = 15)</b>	<b>HAM/TSP (n = 16)</b>
<b>Frequência de células expressando CD107a (valores mínimos-máximos)</b>			
CD56+	4.6 (2.6-12.4)	8 (2.2-39.2) <sup>a</sup>	11.1 (4.4-61.9) <sup>b</sup>
CD56+CD3-	2.3 (0.8-12)	6.7 (1.4-41.9) <sup>a</sup>	6.9 (1.8-57.6) <sup>b</sup>
CD56+CD16+	2.8 (1.5-14)	6.5 (1.7-40) <sup>a</sup>	7.7 (3.4-70.8) <sup>b</sup>
CD56dim	5.1 (3.2-12.9)	8.3 (2.4-40.1) <sup>a</sup>	11.8 (4.4-62) <sup>b</sup>
CD56bright	0.9 (0-11.7)	4.9 (0.7-30.8) <sup>a</sup>	5.4 (0-66.7) <sup>b</sup>
NKT	8.4 (6.6-11.6)	11.8 (6-52.7) <sup>a</sup>	15.8 (6.1-50) <sup>b</sup>
<b>MFI (valores mínimos-máximos)</b>			
CD56+	17.6 (11.1-52)	27.1 (18.7-76) <sup>a</sup>	27 (21-47) <sup>b</sup>
CD56+CD3-	13.1 (9.6-49.2)	22.6 (15.3-48.2) <sup>a</sup>	18.7 (16.3-37.2) <sup>b</sup>
CD56+CD16+	15.1 (10.2-19.7)	23.5 (1.7-92.1) <sup>a</sup>	23.8 (18.1-48.1) <sup>b</sup>
CD56dim	18 (10.9-53.9)	28.9 (2.4-77.2) <sup>a</sup>	26.7 (2.4-50.1) <sup>b</sup>
CD56bright	15.5 (9.5-43.3)	24.4 (0.9-79.9) <sup>a</sup>	26.7 (17.1-38.3) <sup>b</sup>
NKT	25.9 (13.9-52.4)	34.4 (6-85) <sup>a</sup>	29.8 (16.7-75.7)

O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado nas análises estatísticas. Dados estão representados pela mediana (e valores mínimos e máximos).

<sup>a</sup>controles saudios x portadores do HTLV-1 ( $P < 0.05$ )

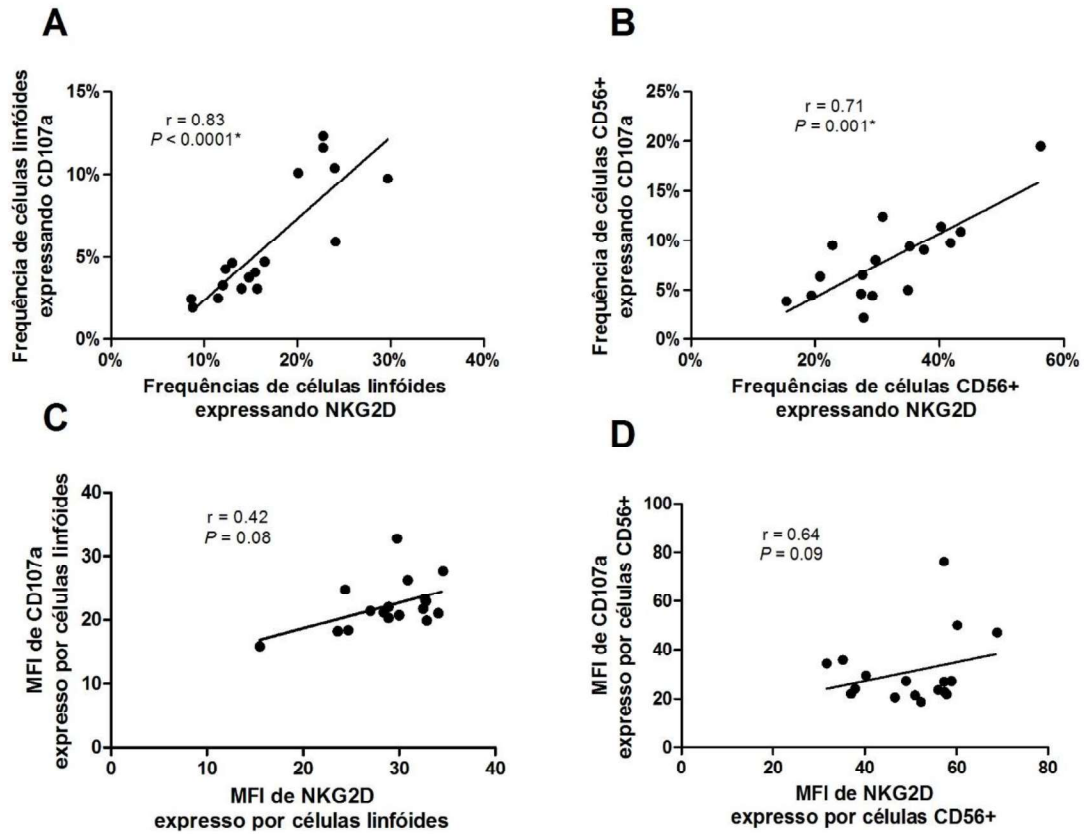
<sup>b</sup>controles saudios x HAM/TSP ( $P < 0.05$ )

**Figura 11. Frequência e MFI de células CD56+ e CD3+CD8+ expressando NKG2D em indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.**



Frequência (A) e MFI (B) de células CD56+ expressando NKG2D. Frequência (C) e MFI da expressão de NKG2D (D) de células CD3+CD8+ expressando NKG2D em controles sadios e indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP). Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis. \* $P < 0.05$ . Acima dos gráficos está representada a estratégia de seleção da expressão de NKG2D por Fluorescência Menos Um/Fluorescence minus one” (FMO), utilizada para controle interno do experimento.

Figura 12. Correlação entre a frequência de células e MFI da expressão NKG2D e CD107a em indivíduos infectados pelo HTLV-1.



Correlação entre a frequência e MFI de células linfóides (A e C) e células NK CD56+ (B e D) expressando NKG2D e CD107a em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (portadores do HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP). O teste não paramétrico r de Spearman foi utilizado nas análises estatísticas.  $*P < 0.05$ .