



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA REGULAÇÃO MOLECULAR DA
APOPTOSE EX VIVO E IN VITRO EM PACIENTES
COM MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-I/
PARAPRESIA ESPÁSTICA TROPICAL**

DANIELE DECANINE

Salvador-Bahia
2001



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ESTUDO DA REGULAÇÃO MOLECULAR DA APOPTOSE
EX VIVO E IN VITRO EM PACIENTES COM MIELOPATIA
ASSOCIADA AO HTLV-I / PARAPARESIA ESPÁSTICA
TROPICAL**

Daniele Decanine

Orientador: Dr. Johan Van Weyenbergh

Dissertação apresentada para a obtenção
do grau de Mestre em Patologia, área de
concentração em Patologia Experimental

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do CPqGM / FIOCRUZ – Salvador – Bahia

Decanine, Daniele

D291e Estudo da regulação molecular da apoptose ex vivo e in vitro em pacientes com Mielopatia Associada ao HTLV-I/Paraparesia Espástica Tropical / Daniele Decanine.

– Salvador: UFBA / CPqGM, 2001.

87p. : ils.

Dissertação (Mestrado em Patologia) –Universidade Federal da Bahia, 2001.

1. Apoptose. 2. HTLV-I. 3. Mielopatia. 4. Interferons.
I. Título.

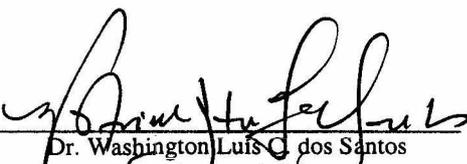
CDU 578.28:616.98

ESTUDO DA REGULAÇÃO MOLECULAR DA APOPTOSE EX VIVO E IN VITRO EM
PACIENTES COM HAM / TSP.

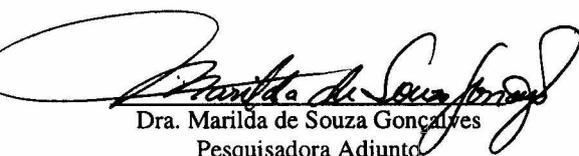
DANIELE DECANINE

FOLHA DE APROVAÇÃO

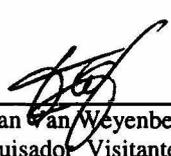
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Washington Luis dos Santos
Pesquisador Adjunto
CPqGM / FIOCRUZ



Dra. Marilda de Souza Gonçalves
Pesquisadora Adjunta
CPqGM / FIOCRUZ



Dr. Johan van Weyenbergh
Pesquisador Visitante
CPqGM / FIOCRUZ

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Rui Decanine** e **Valquiria da Costa Decanine**, familiares e amigos, por terem me apoiado e incentivado a dar continuidade ao meu processo de aprendizagem.*

Agradecimentos

Ao Dr. Johan Van Weyenbergh

Pela sua orientação, dedicação e incentivo.

Ao Dr. Manuel Barral Netto, por ter me concedido à oportunidade de integrar o quadro de pesquisadores do LIM1.

Ao Dr. Bernardo Galvão-Castro, por sua colaboração no que diz respeito à obtenção de pacientes e disponibilização do laboratório P3 para que esta pesquisa pudesse ser realizada.

Ao Dr. Edgar M. Carvalho e Dr. Aurélia Porto, pela colaboração e fornecimento de amostras dos indivíduos assintomáticos.

Ao Dr. Antonio Andrade e Dr. Frederico Figueiroa, pela disponibilização dos pacientes com HAM/TSP (Fundação de Neurologia e Neurocirurgia da Bahia).

A Dr. Marilda Gonçalves, pelo incentivo e colaboração no desenvolvimento das técnicas de biologia molecular.

Ao Dr. Jean Pierre Kolb, pelo apoio e colaboração no desenvolvimento desta pesquisa, no que diz respeito às moléculas apoptóticas e iNOS.

Aos colegas de laboratório (LIM1 e LIP) e aos Amigos do mestrado, pela convivência agradável e pelo companheirismo.

Aos amigos do LASP, pela colaboração, amizade e incentivo.

À Silvia Cardoso, José Roberto, Jorge Tolentino e Lucyvera Imbroinise, pelo carinho e apoio em todos os momentos necessários.

Aos amigos especiais, Claudiane Junqueira, Leila Karine Novaes Soares, Flávia Helena P. de Carvalho, George Mariane Soares, Margarida Pompeu, Clarissa Romero Teixeira, Sandra Gadelha, Jorge Clarêncio, Tônia Duarte, Gisélia Santana e Teolis Barbosa, por terem compartilhado momentos alegres e difíceis no decorrer destes anos.

À minha “mãe” Rosália Meire Oliveira da Silva, pelo carinho especial, amizade, apoio e atenção, além do incentivo em todos os momentos difíceis, durante todos estes anos.

Ao Curso de Pós-Graduação e aos professores pela oportunidade, apoio e incentivo.

Às Bibliotecárias, Ana Fiscina e Vânia pela ajuda na obtenção e organização das referências bibliográficas.

Aos setores de comunicação visual e informática, pelo apoio na elaboração dos recursos visuais necessários em diversos momentos do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Centro de pesquisas Gonçalo Moniz pela disponibilidade do espaço físico, pessoal e recursos que possibilitaram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 HISTÓRICO.....	1
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	3
1.2.1 Distribuição Geográfica.....	3
1.2.2 Modos de Transmissão.....	4
1.3 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DO HTLV-I.....	6
1.4 RESPOSTA IMUNE CELULAR AO HTLV-I.....	7
1.5 APOPTOSE.....	10
1.5.1 Apoptose e HTLV-I.....	14
1.6 DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-I.....	15
1.7 MEDIDAS TERAPÊUTICAS EM HAM/TSP.....	19
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 POPULAÇÃO ESTUDADA.....	23
3.1.1 Assintomáticos e Pacientes HAM/TSP.....	23
3.1.2 Doadores Normais.....	23
3.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS.....	24
3.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	24
3.4 CITOMETRIA DE FLUXO (FACS).....	25
3.4.1 Obtenção de células do sangue total.....	26
3.4.2 Células Mononucleares do Sangue Periférico ex vivo.....	26
3.4.3 Células Mononucleares do Sangue Periférico in vitro.....	27

3.4.4	Aquisição e Análise de Dados.....	27
3.5	ANÁLISE DE RNA.....	28
3.5.1	Extração de RNA.....	28
3.5.2	Amplificação de DNA complementar.....	29
3.5.3	RT-PCR.....	30
3.6	DOSAGEM DE CITOCINAS.....	30
3.7	DOSAGEM DE NITRATO E NITRITO.....	31
3.8	ANÁLISE DE DADOS.....	32
4	RESULTADOS.....	33
5	DISCUSSÃO.....	47
6	CONCLUSÕES.....	57
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
8	ANEXOS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AICD	Morte celular induzida por ativação
ATL	Leucemia de células T no adulto
AZT	Zidovudina
CD	Código de diferenciação
CDNA	DNA complementar
COM	Contagem de células por minuto
CTL	Linfócitos T citotóxicos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Técnica de ensaio imunoenzimático
FACS	Separador de células ativadas por fluorescência
FITC	Isoticianato de fluoresceína
HAM/TSP	Mielopatia associada ao HTLV-I/Paraparesia espástica tropical
HLA	Antígeno de histocompatibilidade leucocitário
HTLV-I	Vírus linfotrópico para células T humanas
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRF-I	Fator regulador de interferon-I
IUD	Usuários de drogas injetáveis
LTR	Seqüências terminais repetidas
MFI	Intensidade mediana de fluorescência
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal
MRNA	RNA mensageiro
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear do gene- κ nas células B
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade óptica
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico

PCR	Reação de polimerase em cadeia
PE	Ficoeritrina
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcriptase reversa
SNC	Sistema nervoso central
TGF- β	Fator de crescimento de células T
Th	Linfócitos T auxiliares
TNF-R	Receptor de TNF
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α

RESUMO

ESTUDO DA REGULAÇÃO MOLECULAR DA APOPTOSE EX VIVO E IN VITRO EM PACIENTES COM MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-I / PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL. **Daniele Decanine.** O vírus linfotrópico de células T humano - tipo I (HTLV-I) é o agente etiológico da Leucemia/Linfoma de células T no adulto (ATL), da Mielopatia Associada ao HTLV-I/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), e de outras patologias. Os IFN- α e IFN- β foram recentemente introduzidos no tratamento de ATL e HAM/TSP, embora seus mecanismos de ação ainda estejam pouco esclarecidos. A presença da iNOS e seu recém-descoberto papel anti-apoptótico na ATL iniciou novas perspectivas terapêuticas. Considerando a correlação entre a linfoproliferação induzida pelo HTLV-I e as patologias associadas, buscamos estudar a regulação molecular da linfoproliferação e da apoptose ex vivo e in vitro em indivíduos soropositivos assintomáticos e pacientes com HAM/TSP. A expressão ex vivo do mRNA das moléculas pró-apoptóticas Fas, FasL e pró-caspase-3 foi maior nos indivíduos assintomáticos quando comparados aos pacientes com HAM/TSP, sugerindo que uma diminuição da morte celular programada poderia ter influência no processo patológico. O aumento do mRNA da iNOS nos assintomáticos foi correlacionado a inibição da linfoproliferação in vitro pelo L-NMMA (inibidor da iNOS). Por outro lado, apenas o IFN- β mostrou atividade anti-proliferativa significativa, mas não pró-apoptótica in vitro em células mononucleares de pacientes com HAM/TSP. Porém, as células mostraram-se sensíveis ao estímulo com anti-CD3 na indução da apoptose. A estimulação com o IFN- β ou anti-CD3 não diminuiu a expressão do mRNA da proteína viral Tax, sugerindo que os efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos ocorrem independente da transcrição viral. De acordo com nossos resultados, o uso combinado de IFN- β e outras drogas antivirais ou pró-apoptóticas poderia ser considerado em futuros ensaios terapêuticos.

Palavras-chave: 1. Apoptose. 2. HTLV-I. 3. Mielopatia. 4. Interferons.

ABSTRACT

STUDY EX VIVO AND IN VITRO OF MOLECULAR REGULATION OF APOPTOSIS IN HTLV-I-ASSOCIATED MYELOPATHY/TROPICAL SPASTIC PARAPARESIS PATIENTS. **Daniele Decanine**. Human T cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) is the etiologic factor for ATL (Adult T cell Lymphoma), HTLV-I-associated myelopathy (HAM), as well as other pathologies. Interferon (IFN)- α e - β have been shown to be effective in ATL e HAM, but their mechanism of action remains unclear. Recently, the presence of iNOS and its anti-apoptotic effect has been demonstrated in ATL, initiating new perspectives for therapy. Considering the correlation between HTLV-I induced lymphoproliferation and associated pathologies, we investigated the molecular regulation of lymphoproliferation and apoptosis ex vivo and in vitro in seropositive asymptomatic individuals and HAM/TSP patients. We found that ex vivo expression of Fas, FasL and pro-caspase-3 mRNA was higher in asymptomatic individuals compared to HAM/TSP patients, suggesting that programmed cell death reduced influence the pathologic process. iNOS mRNA expression was higher in asymptomatic individuals and correlated to the inhibitory effect of L-NMMA (iNOS inhibitor) on in vitro lymphoproliferation. On the other hand, only IFN- β displayed a profound anti-proliferative, but not pro-apoptotic effect in HAM/TSP patients. However, cells were susceptible to apoptosis induction upon anti-CD3 stimulation. IFN- β and anti-CD3 stimulation did not modulate Tax mRNA levels, suggesting that anti-proliferative and pro-apoptotic effects occurred independent of viral transcription. In accordance to our results, the association of IFN- β and others antivirals or pro-apoptotic drugs might possibly be considered in future clinical trials.

Key words: 1. Apoptosis. 2. HTLV-I. 3. Myelopathy. 4. Interferons.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

Em 1977, Takatsuki e colaboradores relataram estudos de um grupo de pacientes portadores de neoplasma linfóide, com quadro clínico bem definido, cujo processo neoplásico foi referido como Leucemia de Células T no Adulto (ATL) (TAKATSUKI et al., 1977; UCHIYAMA et al., 1977). Estudos subseqüentes demonstraram que um retrovírus humano poderia ser o agente etiológico desse tipo de câncer humano. O vírus linfotrópico de células T humano -tipo I (HTLV-I) foi descrito em 1980 como o primeiro retrovírus humano associado a doenças malignas, isolado de um paciente com diagnóstico de Linfoma Cutâneo de Células T, nos Estados Unidos (POIESZ et al., 1980). Um outro retrovírus descrito no Japão foi isolado de um paciente com o diagnóstico de Leucemia de Células T no Adulto (ATL) recebendo o nome de ATLTV (YOSHIDA et al., 1982), o qual posteriormente foi identificado como sendo o mesmo HTLV-I, após comprovação com estudos soroepidemiológicos e moleculares, onde se verificou seqüências nucleotídicas idênticas entre os dois vírus descritos (POPOVIC et al., 1982; WATANABE et al., 1984; GALLO, 1985).

Estudos sorológicos realizados a partir de células T provenientes de um paciente com leucemia de células pilosas levaram à descoberta de um segundo retrovírus em 1982. Apesar deste vírus estar relacionado ao HTLV-I com elevado

grau de homologia (65%) na seqüência do RNA viral, trata-se de um vírus distinto que recebeu a denominação de HTLV-II (KALYANARAMAN et al., 1982).

Os retrovírus compreendem uma extensa família de vírus, primariamente de vertebrados. O HTLV-I é semelhante estruturalmente ao vírus da leucemia de bovinos (BLV) e ao vírus da leucemia de células T de símios (STLV) (LIU et al., 1994). A homologia do genoma de linhagens do HTLV-I com linhagens de STLV é ainda maior que a descrita para o HTLV-I e II (GOUBAU et al., 1996).

Aproximadamente 20 anos após a descoberta do vírus progressos foram realizados em relação à patogênese da infecção viral. A variabilidade genética observada entre as linhagens dos vírus HTLV-I/II tem levado à descrição de subtipos e à construção de árvores filogenéticas que representam as relações evolutivas existentes entre eles. O HTLV-I é classificado em 5 subtipos principais: Cosmopolita (I), Japonês (II), Norte-Africano (III), Centro-Africano (IV) e Malesiano (V) (VIDAL et al., 1994).

No ano de 1985, Gessain e colaboradores descreverem um grupo de pacientes na Martinica que possuíam anticorpos para HTLV-I cujo quadro clínico se apresentava como uma doença neurológica lentamente progressiva denominada Paraparesia espástica tropical (TSP) (GESSAIN et al., 1985). Um ano após esta descoberta, Osame também relatou a existência de anticorpos específicos em pacientes com Mielopatia associada ao HTLV-I (HAM) na região sul do Japão (OSAME et al., 1986). Estudos posteriores estabeleceram que HAM e TSP se tratavam da mesma doença, tendo como agente etiológico o HTLV-I. Este foi o segundo retrovírus, após o HIV, a ser associado a uma doença neurológica em humanos (HAM/TSP).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

1.2.1 Distribuição Geográfica

Epidemiologicamente a infecção pelo HTLV caracteriza-se por agrupamento da infecção em diferentes regiões geográficas do mundo, acometendo milhares de pessoas (MURPHY & BLATTNER, 1988; SARIM et al., 1990; MANNS & BLATTNER, 1991). Indivíduos infectados pelo HTLV-I têm sido identificados entre imigrantes residentes nos EUA e na Europa, sendo que atualmente esta infecção tem sido encontrada em algumas áreas consideradas de alta endemicidade como o Japão, Ilhas do Caribe, parte da África Central, Sudeste da Ásia, bem como partes da América Central e do Sul. O Japão foi a primeira área endêmica conhecida e a soroprevalência estimada para a população geral varia de frequências menores que 1% a frequências de 37-45%, como as descritas no Sudeste (Sudeste da ilha de Shikoku, em Kyushu e Okinawa) e Nordeste do país (PROIETTI, 2000).

Estudos relativos a epidemiologia da infecção pelo HTLV-I têm estimado que 1 a 2 milhões de pessoas estão infectadas no Japão, onde o vírus é endêmico e que aproximadamente 10 a 20 milhões de pessoas no Mundo sejam portadoras desse vírus (MANNS et al., 1999).

No Brasil a prevalência média entre doadores de sangue é cerca de 20 a 100 vezes maior que a relatada nos EUA e Europa, situando-se em torno de 0,45% (GALVÃO-CASTRO et al., 1997). Embora o valor encontrado entre doadores não possa ser extrapolado para a população em geral, pode-se afirmar que o HTLV-I está presente em quase todas as regiões do país, tornando o Brasil uma das

maiores áreas endêmicas mundiais, sendo que a cidade de Salvador detém a maior prevalência (1,76%) de indivíduos infectados em relação aos outros estados brasileiros (DOURADO et al., in press).

A presença de Leucemia de células T no adulto (ATL) no Brasil foi descrita em 1990 (POMBO DE OLIVEIRA et al., 1990) e em relação a HAM/TSP, os primeiros casos relatados foram em 1989 por CASTRO-COSTA em Fortaleza e por MARTINS-CASTRO em São Paulo, o qual detectou anticorpos contra HTLV-I em 37,5% de 16 pacientes atendidos com Mielopatia crônica de origem desconhecida (CASTRO-COSTA et al., 1989; MARTINS-CASTRO et al., 1989). Desde então a HAM/TSP tem sido relatada de forma disseminada por quase todo o país, com variações regionais de prevalência em consonância com a distribuição de soropositivos para HTLV-I (PROIETTI, 2000).

Em praticamente todas as áreas estudadas pode-se observar um aspecto característico da epidemiologia do HTLV: a prevalência dessa infecção aumenta com a idade e é duas vezes maior em mulheres, especialmente nos grupos etários acima de 40 anos (MURPHY et al., 1991; KAJIYAMA et al., 1986; SARIM et al., 1990; MANN & BLATTNER, 1991). Estes dados indicam que provavelmente esta diferença surge após os 30 anos de idade, a partir de uma infecção mais eficiente do homem para a mulher em idade sexualmente ativa.

1.2.2 Modos de Transmissão

O HTLV-I é geralmente transmitido congenitamente através de transmissão vertical de mãe para filho, via pré-natal e sangue transplacentário no processo do nascimento e amamentação; ou ainda pode ser transmitido

horizontalmente através do contato sexual, uso de seringas contaminadas e transfusão sanguínea (KINOSHITA et al., 1984; MAEDA et al., 1984; KAJIYAMA et al., 1986).

Em relação à transmissão vertical, o aleitamento materno demonstra uma taxa de transmissão de 25% em áreas endêmicas, sendo que a via transplacentária apresenta menor proporção, em torno de 0 a 5% (BITTENCOURT, 1998). A frequência da infecção pelo HTLV-I entre mulheres grávidas é relativamente elevada em Salvador, sendo a infecção materna através da amamentação a mais provável e a transmissão sexual a segunda via mais importante (BITTENCOURT et al., 2001). A transmissão horizontal, através do contato sexual, é mais expressiva do homem para a mulher (60%) (KAJIYAMA et al., 1986) do que da mulher para o homem (0,4 a 1%) (KAJIYAMA et al., 1986; KAPLAN et al., 1996).

A transmissão via parenteral ocorre através da transfusão sanguínea, com soroconversão variando entre 44 a 63% em áreas endêmicas (MANNIS et al., 1992). Seringas e/ou agulhas contaminadas são responsáveis pela transmissão horizontal em usuários de drogas e a prevalência entre indivíduos usuários de drogas injetáveis (IUD), em Salvador, foi de 22% em homens e de 46,2% em mulheres (DOURADO et al., 1999).

1.3 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DO HTLV-I

O HTLV-I possui uma estrutura morfológica similar a de outros retrovírus, contendo um envelope, com fita dupla de RNA. O genoma do vírus é composto por três genes codificadores de proteínas estruturais (*gag*, *pol* e *env*), um gene *pX* que codifica várias proteínas regulatórias dentre elas Tax e Rex e seqüências terminais repetidas (LTR) nas duas extremidades do genoma (5' e 3'), que constituem o promotor viral e outros elementos regulatórios, onde se ligam proteínas reguladoras importantes no controle da expressão viral (CANN et al., 1985; FRANCHINI, 1995).

O gene *gag* codifica as proteínas virais gp19 (proteína da matriz), gp24 (proteína do capsídeo) e gp15 (proteína do nucleocapsídeo); o gene *pol* codifica a Transcriptase Reversa (RT) e a Integrase; e o gene *env* codifica as proteínas do envelope viral, a proteína transmembrana gp21 e a glicoproteína de superfície gp46. O desvio de leitura da região *gag* e *pol*, no genoma do HTLV-I, codifica a protease que é responsável pela clivagem das cadeias poliprotéicas formando proteínas estruturais maduras. As proteínas regulatórias Tax e Rex são responsáveis por transativar a replicação e a transcrição viral (FRANCHINI, 1995).

1.4 RESPOSTA IMUNE CELULAR AO HTLV-I

A infecção por HTLV-I está altamente associada a células TCD4⁺, visto que este vírus possui um tropismo especial para este tipo celular (RICHARDSON et al., 1990). Porém, este mesmo vírus pode infectar linfócitos TCD8⁺ in vivo desencadeando uma proliferação clonal espontânea similar à desencadeada por células TCD4⁺ (WUCHERPFENNIG et al., 1992; NAGAI et al., 2001). As células infectadas com HTLV-I aumentam a expressão dos seus marcadores de superfície, concomitante à indução de uma proliferação espontânea de linfócitos T, que pode levar ao estabelecimento de uma infecção persistente (RICHARDSON et al., 1997).

A propagação do vírus no organismo ocorre geralmente por interações entre as células T, sendo que a infecção através de vírions livres é extremamente ineficiente (HÖLLSBERG, 1999). Linfócitos T ativados e infectados por HTLV-I expressam epitopos virais no contexto MHC classe I causando uma ativação de células precursoras T CD8⁺ citotóxicas antivirais restritas ao MHC-I (BUCLKE et al., 1996), além de possuir a capacidade de desencadear uma resposta autoimune através do reconhecimento de antígenos próprios ou peptídeos virais no contexto MHC II, na ausência da expressão das moléculas coestimulatórias B7-1 e B7-2 (SCHOLZ et al., 1996).

Interações entre células TCD4⁺ infectadas e células TCD8⁺ não infectadas podem ocorrer quando células TCD8⁺ específicas reconhecem o peptídeo viral no complexo MHC-I, causando infecção de algumas células TCD8⁺ e consequente expansão de clone infectado de células TCD8⁺ vírus-específica (BUCKLE et al.,

1996). Indivíduos naturalmente infectados pelo HTLV-I possuem uma proporção significativa de linfócitos TCD8⁺ infectados e a expressão de *tax* nesses linfócitos os tornam susceptíveis ao fratricídio mediado por linfócitos T citotóxicos vírus-específicos podendo, todavia prejudicar o controle imune do HTLV-I e contribuir para a persistência do vírus in vivo (HANON et al., 2000).

A proliferação exacerbada de linfócitos T é um efeito direto da infecção por HTLV-I e ocorre devido à ativação do promotor de determinados genes da célula T (IL-2, IL-2R α , IL-15 e IL-15R α) (AZIMI et al., 1999; WODARZ et al., 1999). A secreção autócrina de IL-2 é baixa em linfócitos T infectados por HTLV-I e a via IL-2R pode ser ativada por uma citocina recentemente descoberta, a IL-15, a qual utiliza as cadeias β e γ do IL-2R para sua sinalização (GIRI et al., 1994; BAMFORD et al., 1994). A IL-2 e IL-15 através das cadeias β e γ do receptor IL-2R utilizam em comum os elementos sinalizadores JAK/STAT induzindo a estimulação da proliferação de todas as subpopulações de células T ativadas (WALDMANN et al., 2001).

Estudos recentes utilizando linhagens de células T transformadas por HTLV-I sugerem que JAK 1 e 3 são ativados constitutivamente e associados às cadeias β e γ do receptor de IL-2, respectivamente. Em adição, os transdutores de sinais e ativadores de transcrição celular STAT 3 e 5 também são ativados constitutivamente (MIGONE et al., 1995).

Em contraste com a IL-2, a IL-15 manifesta ações anti-apoptóticas atuando como fator de crescimento e inibindo a morte celular induzida por ativação (AICD), além de estimular a homeostase das células TCD8⁺ de memória

(ZHANG et al., 1998; MARKS-KONCZALIKI et al., 2000; WALDMANN et al., 2001).

A infecção pelo HTLV-I além de desregular os mecanismos de ativação e proliferação celular também modula diferencialmente a produção de citocinas *in vitro* (MACCHI et al., 1998). Esta infecção viral causa um aumento na secreção policlonal de citocinas como IL-4, IL-2, IL-6, IL-5, TNF- α , IL-10 e IFN- γ , não apresentando um padrão clássico Th1 ou Th2 (MACCHI et al., 1997; CARVALHO et al., 2001). Este vírus também é capaz de interferir com o perfil de citocinas produzido por clones de células TCD4⁺ Th1 e Th2 já estabelecidos, o que difere dos doadores normais (MACCHI et al., 1998). Dentro dessa gama de citocinas foi sugerido um possível papel deletério do IFN- γ na patogênese da HAM/TSP, já que houve um aumento significativo dessa citocina intracelular em células T CD8⁺ quando comparou-se indivíduos assintomáticos e sintomáticos (KUBOTA et al., 2000). Por outro lado, de acordo com a ação antiviral, antiproliferativa e imunomodulatória dos interferons, o IFN- α e IFN- β tem mostrado um efeito clínico benéfico significante nas patologias associadas ao HTLV-I (IZUMO et al., 1996; HERMINE et al., 1995) e na esclerose múltipla (HUA et al., 1998; IFN MS STUDY GROUP, 1993), respectivamente.

Os interferons (IFN) foram identificados como fatores produzidos por células infectadas pelo vírus permitindo a resistência destas à infecção viral (ISAACS & LINDENMANN, 1957). Os IFN- α e IFN- β se ligam ao mesmo receptor celular e são considerados interferons do tipo I os quais diferem do interferon do tipo II, o IFN- γ . Estes IFN do tipo I possuem efeitos pleiotrópicos no sistema imune, incluindo a regulação da expressão de MHC I e II em todos os

tipos celulares e a ativação de macrófagos e células Natural Killer (NK). Uma outra característica dos IFN é o seu papel na ativação e sobrevivência de ambas as células T CD4⁺ e CD8⁺ (SIEGAL, 1999; SANCÉAU & WIETZERBIN, 1997).

Dentre as funções biológicas dos IFN, está a sua capacidade de manipular os eventos mediadores da morte celular programada, tendo sua participação através de uma regulação transcricional de proteínas pró e anti-apoptóticas (ARNOLD et al., 1999; PILLING et al., 1999).

1.5 APOPTOSE

A apoptose é definida como a morte celular programada, possuindo um papel importante no desenvolvimento embriológico normal e na homeostase de tecidos e órgãos, inclusive órgãos linfóides (do sistema imune), sendo também descrita em circunstâncias patológicas variadas (CUMMINGS et al., 1997).

Este tipo de morte celular afeta, em grande parte, células individuais e é identificada por uma série de mudanças morfológicas, tais como a redução celular, condensação da cromatina em direção à membrana nuclear, fragmentação nuclear, rompimento da célula em vesículas com organelas intactas e fragmentos nucleares, chamados de corpos apoptóticos, que são fagocitados por macrófagos ou células vizinhas. A degradação do DNA em fragmentos de 50 a 300 Kb é uma das características principais da apoptose (HOCKENBERY, 1995; GRANVILLE et al., 1998).

A morte celular programada pode ocorrer devido a exposições físicas (radiação ionizante, hipertermia) e tóxicas (peróxido de hidrogênio); citocinas (IL-2, TNF, TGF- β); radicais livres; infecções virais e mecanismos imunologicamente relevantes como a morte mediada por linfócitos T Citotóxicos (LT CD8⁺), mediada por receptores antígeno-específicos, por anti-imunoglobulinas e por receptores sinalizadores de células T (CD95, TNF-R) (HOCKENBERY, 1995), que ativam ao menos duas vias sinalizadoras através de seus domínios intracelulares (Figura 1 - em Anexo). A primeira via envolve a cascata do domínio de morte (DD) que se comunica através das caspases e o segundo inclui a cascata da proteína quinase e algumas proteínas da família do fator associado ao TNF (TRAF) que ativa o NF- κ B (ARAVIND et al., 1999).

As caspases possuem função efetora na apoptose e são pertencentes a um grupo de proteínas classificadas de 1 a 13 que clivam proteínas na porção carboxi-terminal de resíduos de ácido aspártico. Elas são sintetizadas como zimogênios que requerem clivagem proteolítica para gerar subunidade ativa, que é conduzida por outras caspases, representando o componente maior na sinalização da apoptose (KOLENKO et al., 1999). Esta sinalização está associada inicialmente a ativação da pró-caspase 1 (IL-1 β *converting enzyme* – ICE) desencadeando a ativação da caspase 8 que pode agir de duas formas: clivando o membro pró-apoptótico da família Bcl-2, o BID, induzindo a liberação do citocromo c e iniciando a apoptose via Apaf-1 ou desencadeando diretamente uma cascata inicializadora por clivagem e ativação de outra caspase, a caspase-3 que induz a fragmentação do DNA por clivagem e inibição do substrato caspase, I^{CAD} (inibidor de DNase ativada por caspase)/DFF (fator de fragmentação do DNA)

além de clivar proteínas estruturais como a actina, α -fodrina, laminina A e B, dentre outras (GRANVILLE et al., 1998; SCAFFIDI et al., 1999). A pró-caspase-1 (IL-1 β *converting enzyme* – ICE), intermediária no processamento de IL-1 β e IL-18 (FANTUZZI & DINARELLO, 1999), é dotada de atividade pró-inflamatória, além de ser uma proteína pró-apoptótica, enquanto que a pró-caspase-3 é exclusivamente pró-apoptótica.

O NF- κ B possui um papel importante no desenvolvimento e regulação do sistema imune, nas respostas inflamatórias e na proliferação e morte celular. A família NF- κ B consiste de membros múltiplos como o NKF- κ B1 (p50 / p105), NF- κ B2 (p52 / p100), RelA (p65), RelB e c-Rel que modulam os diversos processos biológicos através da regulação da expressão de uma variedade de citocinas e receptores, quimiocinas, moléculas de adesão, receptores de superfície, fatores de crescimento hematopoiético, proteínas de fase aguda e fatores de transcrição (HETTMANN et al., 1999), assim como, regulam transcricionalmente a indução do gene da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (NUNOKAWA et al., 1996). Em resposta a estímulos diversos, o I κ B, proteína inibidora de NF- κ B, é fosforilado e ubiquinado e sua degradação é mediada por proteossomas. Este processo libera o NF- κ B de seu inibidor e o transloca rapidamente para o núcleo, onde se liga à região promotora dos genes com sítios de ligação para NF- κ B. A inibição da translocação nuclear de NF- κ B aumenta a susceptibilidade à morte celular principalmente por regular a expressão dos membros da família Bcl-2 (ADAMS & CORY, 1998).

A Bcl-2 é uma família de proteínas formada por membros pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bcl-x_s, Bok/Mtd, Bad, Nbk/Bik, Bid, Bim, Hrk, Blk e BNIP3) e anti-

apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A-1/Bfl-1) que regulam, dentre outras funções, o efluxo de citocromo c da mitocôndria para o citossol (ARAVIND et al., 1999). Uma característica acentuada do Bcl-2 e demais membros anti-apoptóticos é sua capacidade de promover proteção contra uma variedade de estímulos de morte, como danificação no DNA, inibição metabólica, expressão oncogênica e tratamento com glicocorticóides, podendo ainda, proteger a morte celular induzida por CD95 em alguns tipos celulares (RATHMELL & THOMPSON, 1999).

A iNOS, enzima que induz a síntese de óxido nítrico (NO), é uma molécula envolvida em processos inflamatórios e defesa anti-microbiana em adição a neurotransmissão e homeostase vascular (ALDERTON et al., 2001). O óxido nítrico possui efeitos contrastantes na apoptose, podendo ser pró ou anti-apoptótico dependendo da sua concentração, atividade e tipo celular. Seus efeitos são observados quando esta molécula estimula a expressão de enzimas e fatores de transcrição envolvidos no reparo de DNA e modulação da apoptose assim como genes tumorais (p53), transativando a expressão dos genes pró-apoptóticos (Bax e inibidores cdk) diminuindo a expressão do Bcl-2 (anti-apoptótico). Por outro lado, o NO é capaz de inativar caspases através da oxidação e S-nitrosilação de cisteína ativa, bloqueando o processo apoptótico, além de modular os membros da família Bcl-2 que controlam a permeabilidade mitocondrial, indução das *heat shock protein* (HSP 70) e interação com a via das ceramidas (KOLB, 2000).

1.5.1 Apoptose e HTLV-I

A apoptose nas infecções virais se apresenta como um mecanismo de defesa do organismo para prevenir a propagação viral (THOMPSON, 1995). Inúmeros vírus têm desenvolvido mecanismos para interferir na regulação normal da apoptose em células infectadas, dentre eles se encontra o HTLV-I que não é capaz de induzir a morte celular programada em células infectadas, o contrário do que ocorre com infecção pelo vírus HIV (BADLEY, 2000).

Linhagens de células T infectadas com HTLV-I se mostram parcialmente resistentes a vários mecanismos indutores de apoptose (BRAUWEILER et al., 1997) e a ativação de NF- κ B via Tax em células infectadas pode tornar estas células resistentes a apoptose (KAWAKAMI et al., 1999; SUN & BALLARD, 1999). Por outro lado, linhagens de células transfectadas com Tax mostram ambos os efeitos pró e anti-apoptóticos a depender do estímulo empregado. Em algumas linhagens celulares o Tax é capaz de induzir a apoptose (CHEN et al., 1997; NICOT & HARROD, 2000) e em outras linhagens, o Tax possui um efeito anti-apoptótico (KISHI et al., 1997; TSUKAHARA et al., 1999; SAGGIORO et al., 2001). Todavia, já está bem descrito que o vírus por si só é aparentemente anti-apoptótico (HAMASAKI et al., 2001; FURUKAWA et al., 2001).

A proteína Tax possui 42kD e constitui-se no principal fator transativador do HTLV-I, atuando indiretamente na indução da transcrição do genoma viral (proteína p40) e de diversos genes celulares (SODROSKI et al., 1984). Esta proteína ativa pelo menos três regiões regulatórias do promotor: 1. A sequência CRE (elementos responsivos do cAMP), à qual se ligam as proteínas CREB/ATF ou CREM; 2. O sítio de ligação para membros da família NF- κ B (fator de

transcrição nuclear do gene κ nas células B); 3. A seqüência SRE (elementos responsivos ao soro) que se liga aos SRF (fator responsivo do soro). Estas seqüências ativadas podem conduzir ao crescimento celular sem a necessidade de sinais extracelulares (ZHAO & GIAM, 1992; SUZUKI et al., 1993). A expressão de Tax induz a translocação de NF- κ B para o núcleo, com a redução do complexo I κ B α -NF- κ B, e mantém a ativação constitutiva de NF- κ B em células T infectadas (BÉRAUD & GREENE, 1996; YOSHIDA, 2001). Atualmente, o NF- κ B é considerado um fator primordial para a apoptose em diversas patologias, o qual possui efeitos pró e anti-apoptóticos (AGGARWAL, 2000; BALDWIN, 2001).

1.6 DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-I

O número de doenças associadas ao HTLV-I vem aumentando com o passar dos anos, incluindo atualmente, Artropatia (HAAP) (NISHIOKA, 1989), Polimiosite (MORGAN, 1989), Uveíte (HAU) (MOCHIZUKI, 1992), Linfoma cutâneo de células T (CTCL) (HALL et al., 1991) e muitas outras doenças (MANNIS et al., 1999), sendo que as mais importantes e bem caracterizadas são a Leucemia de células T no Adulto (ATL) e a Mielopatia associada ao HTLV-I/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP).

Dentre os indivíduos infectados pelo HTLV-I, um número considerável de soropositivos desenvolvem ATL (2-3 %) (KONDO et al., 1987), um tipo de linfoma com péssimo prognóstico. Cerca de 5% dos infectados desenvolvem HAM/TSP e a soma das patologias associadas com HTLV-I acomete em torno de

10% dos soropositivos (DE THÉ, 1993), sendo que o restante permanece assintomático. Embora a Leucemia/Linfoma de células T e Mielopatias associadas ao HTLV-1 raramente coincidem, devido provavelmente, a uma resposta imune diferencial à infecção (MANNIS et al., 1999), um estudo realizado aqui no Brasil entre 1994 e 1998 demonstrou a presença de HAM/TSP em 9% dos indivíduos com ATL (POMBO DE OLIVEIRA et al., 1999).

Na HAM/TSP encontramos manifestações clínicas variadas, onde a principal característica é uma paraparesia progressiva incapacitante. Estes sintomas ocorrem devido a uma dismielinização crônica e progressiva do cordão espinhal (KUBOTA et al., 1998). O quadro clínico dessa doença é de início insidioso e de caráter lentamente progressivo (PROIETTI, 2000).

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar o papel do HTLV-I no desenvolvimento da mielopatia associada ao HTLV-I. Aventa-se a possibilidade de que a dismielinização do cordão espinhal é consequência de uma resposta citotóxica direta às células infectadas no Sistema Nervoso Central (SNC) ou uma resposta por citocinas (TNF- α) envolvidas na destruição da bainha de mielina (KUBOTA et al., 1998). Outra explicação seria um processo autoimune, onde células autorreativas ou células T CD4⁺ ativadas contra antígenos virais tivessem uma reação cruzada aos antígenos do SNC (HÖLLSBERG, 1997). As células T CD4⁺ infectadas por HTLV-I são destruídas por linfócitos T CD8⁺ vírus-específicos através de uma resposta imune citotóxica (HANON et al., 2000) observada na maioria dos pacientes HAM/TSP, protegendo in vivo contra a doença inflamatória através da redução da carga proviral; todavia, quando esta carga proviral excede um nível limiar, os linfócitos citotóxicos específicos

contribuem para o desenvolvimento da inflamação e conseqüentemente para a patogênese das doenças associadas ao HTLV-I (BANGHAM, 2000). A maioria destas células presentes no local da dismielinização, apresentam produção de substâncias como a matriz metaloproteinase-9, MIP-1 α (quimioatrativo para macrófagos e leucócitos) que facilitam a entrada de outras células no SNC e a secreção da IL-16, cujo efeito quimiotáxico sobre linfócitos TCD4⁺ dão suporte a possibilidade de um processo autoimune (BIDDISON et al., 1997).

Os indivíduos assintomáticos apresentam uma carga viral elevada às vezes semelhante à carga viral dos sintomáticos e com isso correm o risco de desenvolver doença inflamatória. A resposta imune do hospedeiro não tem impacto relevante nos níveis de linfócitos T citotóxicos, mas diminui significativamente a carga viral nos indivíduos infectados (WODARZ et al., 1999). O aumento da carga proviral em portadores sintomáticos sugere a existência de fatores genéticos contribuindo para a replicação do HTLV-I in vivo e iniciando o processo patogênico na HAM/TSP (NAGAI et al., 1998; HASHIMOTO et al., 1998).

Uma pesquisa realizada no Japão sugeriu a associação da doença com antígenos de leucócitos humanos (HLA), pois alguns haplótipos de HLA I e II (A26, B61 e DR9) podem ser superexpressados na ATL (SONODA et al., 1996). Por outro lado, vários alelos de classe II como os DRB1*1501 e DQB1*0606 apresentaram-se distintos entre os portadores de ATL, portadores de HAM/TSP, indivíduos assintomáticos e nos controles normais (MANNS et al., 1999). Em relação a HAM/TSP foi demonstrado, por Jeffery e colaboradores, que os

indivíduos infectados por HTLV-I com subtipos HLA-A*02 e/ou HLA-Cw*08 apresentaram a carga viral reduzida prevenindo em 36% o desenvolvimento desta patologia, enquanto que a presença do subtipo HLA-B*5401 mostrou-se associada a uma susceptibilidade maior para o desenvolvimento de HAM/TSP e carga viral aumentada (JEFFERY et al., 1999).

Os fatores genéticos do hospedeiro e os subgrupos HTLV-I (*taxA* e *taxB*) estão associados a diferentes riscos para o desenvolvimento de HAM/TSP, visto que, as diferenças no gene *tax* podem influenciar a carga viral através da transativação da proteína Tax ou pelo reconhecimento de linfócitos T citotóxicos (NIEWIESK et al., 1995). A seqüência molecular do HTLV-1 encontrada em portadores HAM/TSP, ATL ou em assintomáticos não mostra diferença significativa (JACOBSON, 1996) sendo que, o gene *tax* do HTLV-I é pouco variável entre pessoas infectadas, não existindo diferença significativa relativa a carga viral nos indivíduos infectados por HTLV-I *taxA* ou *taxB* (HAM/TSP e assintomáticos). Porém, foi verificada uma correlação entre a diminuição da freqüência de HLA-A2 e indivíduos infectados por HTLV-I *taxA*, considerando que em relação a HAM/TSP, o subgrupo *taxA* apresenta risco aumentado para o desenvolvimento desta doença, quando comparado ao subgrupo *taxB* (FURUKAWA et al., 2000B).

1.7 MEDIDAS TERAPÊUTICAS EM HAM/TSP

Devido à escassez de conhecimentos em relação aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas infecções pelo HTLV-I, até o presente momento, não existem medidas terapêuticas específicas e comprovadamente eficazes contra HAM/TSP. Os primeiros relatos terapêuticos foram relacionados à utilização de corticosteróides sob a forma de Prednisona, em doses orais de 60 a 80mg por dia ou em dias alternados, observando-se melhoria da marcha e da disfunção esfinteriana, principalmente nas primeiras semanas de tratamento (OSAME et al., 1990).

Vários outros pesquisadores têm obtido resultados benéficos com a utilização de drogas alternativas como, por exemplo, a vitamina C, prednisona, metilprednisona, hidrocortisona e eritromicina dentre outras (NAKAGAWA et al., 1996). Com a utilização de gamaglobulina em doses elevadas obteve-se sucesso em algumas doenças imunomediadas e na HAM/TSP (KURODA et al., 1991).

Uma das estratégias para combater as doenças associadas ao HTLV-1 seria a administração de drogas que impedissem a replicação viral antes e depois da doença instalada (WODARZ et al., 1999).

Entre as drogas antivirais, a zidovudina (AZT) que é um potente inibidor da transcriptase reversa (RT) e da replicação viral *in vitro*, seria uma droga potencialmente benéfica no tratamento da HAM/TSP, entretanto, em um estudo aberto realizado em cinco pacientes não foi possível observar a melhora esperada (GOUT et al., 1991). Em outro estudo aberto com administração de AZT pôde-se verificar por um curto período a diminuição da média da escala de incapacidade

de Kurtzke de 5,5 para 4,0 em 7 dos 10 pacientes tratados; todavia, com a interrupção da medicação, a melhora desapareceu em todos os pacientes (SHEREMATA et al., 1993). Recentemente, Taylor e colaboradores demonstraram que o tratamento da HAM/TSP com AZT não estava levando a diminuição no número de cópias do DNA proviral, na frequência de CTL e no fenótipo de linfócitos T, sendo que a administração de outra droga antiviral, a lamivudina, resultou na diminuição da carga de DNA proviral correlacionada com a queda da replicação viral ativa através de transcriptase reversa (RT) (TAYLOR et al., 1999).

O IFN- α _utilizado no tratamento da HAM/TSP propiciou a melhoria clínica em 64,7% dos 17 pacientes analisados por Shibayama e colaboradores (1991). Kuroda e colaboradores em um estudo aberto também puderam observar melhoria em 71% dos pacientes (KURODA et al., 1992). Posteriormente, foi realizado no Japão um estudo duplo cego, randomizado e multicêntrico onde se verificou uma responsividade boa em 66,7% dos pacientes (IZUMO et al., 1996).

Em analogia à Esclerose Múltipla, o IFN- β está sendo introduzido num ensaio clínico de fase-1 no tratamento da HAM/TSP (JACOBSON S. e MELO A. – NIH e HUPES/UFBA – comunicação pessoal). Por outro lado, o IFN- β mostrou-se ineficiente *in vitro* na ação antiproliferativa de células T infectadas (SMITH et al., 1999).

Considerando a característica de proliferação espontânea presentes nos linfócitos dos indivíduos infectados por HTLV-1 e sua provável correlação com as patologias associadas, pretendemos investigar as vias moleculares envolvidas

nesta infecção, buscando maneiras de intervir na hiperproliferação dos linfócitos, como por exemplo, através da indução de morte celular programada (apoptose).

Em 1999 dois grupos distintos de pesquisadores observaram em clones de células T isolados de pacientes com Leucemia de células T no Adulto (ATL), a presença de *NO sintase induzível* (iNOS) e seu possível efeito anti-apoptótico (SONOKI et al., 1999 & MORI et al., 1999), como já havia sido demonstrado em linhagens de células isoladas de pacientes com Leucemia de células B (ZHAO et al., 1998), abrindo novas perspectivas terapêuticas em ambas as patologias.

2 OBJETIVOS

GERAL

Estudar a regulação molecular da apoptose ex vivo e in vitro em células mononucleares de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (assintomáticos e pacientes com HAM/TSP).

ESPECÍFICOS

- Verificar a presença e o possível papel da iNOS na proliferação celular e na apoptose em indivíduos infectados pelo HTLV-I (assintomáticos e pacientes com HAM/TSP).
- Investigar o efeito do IFN- α e - β (endógeno e exógeno) na proliferação e na apoptose em células mononucleares de indivíduos infectados pelo HTLV-I correlacionando indivíduos assintomáticos e pacientes com HAM/TSP.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Participaram desse estudo indivíduos infectados pelo vírus HTLV-I, incluindo 30 indivíduos assintomáticos e 25 pacientes com HAM/TSP. Como controles sadios utilizamos 08 doadores normais, soronegativos pra o HTLV-I, analisados na Fundação Hemocentro da Bahia (HEMOBA), localizada na cidade de Salvador.

3.1.1 Assintomáticos e Pacientes HAM/TSP

Os indivíduos assintomáticos foram selecionados no Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) da UFBA e na Fundação de Neurologia e Neurocirurgia da Bahia (FNN), os quais apresentavam sorologia positiva para HTLV-I e ausência de sintomas clínicos evidentes. Todos pacientes com HAM/TSP, demonstrados na Tabela 1 (em anexo), foram recrutados através da FNN, após assinarem um termo de consentimento autorizando a coleta de sangue e a participação no estudo.

3.1.2 Doadores Normais

A inclusão dos indivíduos neste grupo foi realizada a critério do HEMOBA. Após a coleta do material, o Hemocentro se encarregou de realizar testes sorológicos para sífilis, chagas, hepatites B e C, HIV e HTLV-I e II.

3.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS

As células mononucleares foram isoladas e purificadas do sangue periférico através de um gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma e Pharmacia) (BOYUM, 1968), cultivadas na concentração de 5×10^6 /ml em suspensão com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*) (Gibco-BRL) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Hyclone), 1% de L-glutamina (2mM) e 50 μ g/ml de gentamicina. Estas células foram distribuídas em placas de 24 poços, cada poço contendo 0,5 ml de suspensão celular (VAN WEYENBERGH et al., 1998) e cultivadas por 72 horas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Alguns poços foram estimulados com 10³ U/ml de IFN- α e - β (Schering e SERONO, respectivamente), 2mM de inibidor de iNOS (L-NMMA), 0.2 μ g/ml de α -CD3 (Pharmlingen/ purificado, sem endotoxina e sem AZIDA).

Após 72 horas de cultivo, as células foram coletadas e processadas para análise de citometria de fluxo e extração de RNA e os respectivos sobrenadantes aliqüotados para as dosagens de IFN- γ e nitrito e nitrato.

3.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC), isoladas através de gradiente de Ficoll-Hypaque, foram ressuspensas em 200 μ l/poço de meio DMEM completo na concentração de 1×10^6 /ml e cultivados em placas de microtitulação fundo U (96 poços), na ausência ou presença de estímulos

exógenos, por quatro dias à 37°C em 5% de CO₂ e 95% de Umidade. Os PBMC foram estimulados ou não com IFN- α , IFN- β , L-NMMA e α -CD3, dispostos em triplicatas. Após este período, foi adicionado à cultura ³H-timidina (0,5 μ Ci/200 μ l) (MACCHI et al., 1997) e estas células permaneceram por mais 16 horas (*overnight*) à 37°C em 5% de CO₂ e 95% de umidade.

A incorporação de ³H-timidina foi medida através da contagem no gás de cintilação (*β -scintillation counter*) (PACKARD - MATRIX™ 9600) e os dados expressos como média total das contagens das culturas triplicatas (*cpm - counts per minute*).

3.4 CITOMETRIA DE FLUXO (FACS)

A análise fenotípica das células foi realizada em sangue total e em PBMC *ex vivo* e *in vitro* de doadores normais, pacientes HAM/TSP e assintomáticos, através do citômetro de fluxo FACSsort (*Becton Dickinson Immunocytometry systems*, San Jose, CA). A marcação com anticorpos específicos (CD3-FITC, CD19-FITC, CD56-PE, AnexinaV-FITC, HLA-DR-PE, CD95/APO-PE e CD95L-FITC) permitiu a identificação de células apoptóticas, além de quantificar a expressão de Fas e FasL (VAN WEYENBERGH et al., 1998).

3.4.1 Obtenção das Células do Sangue Total

As amostras de sangue total (50µl) foram suspensas em 50µl de PBS+1%BSA+0.1%AZIDA (PBA) e incubadas, à 4°C por 30 minutos, com anticorpos fluorescentes especificados na Tabela 2 (em anexo). Após este período foi realizada a lise das hemácias utilizando 1 ml da solução comercial de lise (*Lysing solution*, BDIS – San Jose, CA) em cada tubo da amostra, os quais foram homogeneizados em vortex e mantidos à temperatura ambiente por 10 minutos. Subseqüentemente, foram realizadas duas lavagens com 1 ml de PBA por tubo e centrifugações a 200g (1000rpm)/ 4°C por 5 minutos. Ao final, as células foram ressuspendidas em 200µl/tubo de formalina 1% (CH₂O) e acondicionadas no escuro à 4°C, para serem, posteriormente, adquiridas e analisadas.

3.4.2 Células Mononucleares do Sangue Periférico ex vivo

Os PBMC, após separação por gradiente Ficoll-Hypaque, foram ressuspendidos em meio DMEM completo à densidade de 1×10^6 /ml e dispostos à 40µl por tubo. Em cada tubo foi adicionado 20µl de PBA + 20µl de plasma humano com a finalidade de bloquear as células e reduzir as ligações inespecíficas dos anticorpos. Após 15 minutos de bloqueio, os anticorpos específicos foram adicionados aos tubos e incubados no escuro por 30 minutos à 4°C, onde posteriormente procedeu-se duas lavagens com 150µl/tubo de PBA e centrifugações com 200g (1000rpm)/ 4°C/ 5 minutos. Depois das lavagens, as células foram fixadas com 200µl/tubo de formalina 1% e acondicionadas no escuro à 4°C.

3.4.3 Células Mononucleares do Sangue Periférico *in vitro*

As células mononucleares foram destacadas (*scraper*) dos poços da placa de cultura após 72 horas, e centrifugadas à 200g (1000rpm)/ 4°C por 10 minutos. O concentrado (*pellet*) das células foi então ressuspenso em PBA e plasma humano (1/1) e incubado, no gelo, por 15 minutos. Após o bloqueio, o protocolo de marcação foi o mesmo utilizado no item 3.4.2.

3.4.4 Aquisição e Análise de Dados no Citômetro de Fluxo

Para aquisição das amostras no citômetro, primeiramente seguiu-se a definição dos parâmetros de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) e seleção de linfócitos na região denominada *gate*. Foram realizadas também compensações, ou seja, a aquisição de controles compostos por células não marcadas e isotópicas, com a finalidade de diferenciar a emissão de luz em comprimento de onda não definido da resultante da verdadeira presença de marcação. Foram utilizados dois tipos de fluorocromo na mesma célula.

A porcentagem de células positivas foi calculada e os resultados foram apresentados em intensidade mediana de fluorescência (MFI), após dedução do valor do controle (isotipo), utilizando-se o *software CELLQuest* (versão 3.1F, BDIS – San Jose, CA).

3.5 ANÁLISE DE RNA

O RNA dos indivíduos assintomáticos e dos pacientes com HAM/TSP foi extraído e posteriormente amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa (RT-PCR) utilizando oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) específicos para iNOS, Fas e FasL, pró-caspase 1 e 3 e para a proteína viral Tax, cujas especificações encontram-se descritas na Tabela 3 (em anexo).

3.5.1 Extração de RNA

Para a extração de RNA, as células foram ressuspensas em Trizol (Gibco-BRL) na concentração de 1ml para cada 10^7 células e acondicionadas à -20°C para separação posterior das fases. Na etapa seguinte, foram adicionados 0,2ml de clorofórmio (por 1ml de Trizol), homogeneizando no *vórtex* e centrifugando à 12000g (10000rpm)/ 2°C / 15 minutos. Após a centrifugação seguiu-se à etapa de precipitação dos RNA, onde transferimos a fase aquosa dos tubos centrifugados para outro ependorff, adicionamos 0,5ml de isopropanol por tubo; a solução foi homogeneizada por *vórtex* e incubada por 12 horas a -20°C . Na seqüência centrifugamos à 12000g (10000rpm)/ 2°C / 15 minutos, onde posteriormente descartamos o sobrenadante sem tocar no *pellet* e adicionamos 1ml de etanol (75%) gelado para a lavagem dos RNA, depois centrifugamos novamente à 12000g (10000rpm)/ 2°C / 15 minutos e após a segunda lavagem, desprezamos o sobrenadante e ressuspendemos o concentrado de RNA em água Milli-Q com 0,1% de dietil-pirocarbonato (DEPC) estéril ou em água estéril apirogênica (*Braun*), tendo o cuidado de colocar as alíquotas imediatamente no nitrogênio

líquido e acondicioná-las a -70°C . Após a extração, preparamos um gel de agarose a 1% em tampão 3-[N-Morfolino] propano - ácido sulfônico (MOPS) 1X para verificar a quantidade e pureza dos RNAs.

3.5.2 Amplificação do DNA complementar

Realizamos a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir dos RNA, de acordo com o Kit SuperscriptTMII (Gibco-BRL), tendo o cuidado de realizar um controle negativo, sem transcriptase reversa (RT), para cada amostra. Primeiramente, adicionamos a mistura de reação para a amplificação de cDNA, composto por *random hexamer primer* (250ng/ml), mistura de desoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs) (10mM), tampão com 250mM de Tris-HCl, 375 mM de KCl e 15mM de MgCl_2 (5X), Dithiothreitol (DTT) (0,1 M) e água estéril apirogênica (*Braun*) aos ependorffs contendo RNA e os transferimos para o termociclador de temperatura à 65°C por 5 minutos para a desnaturação dos RNA, logo em seguida estes ependorffs foram colocados à 0°C por 1 minuto e centrifugados por 1 segundo para posteriormente ser adicionado unidades da transcriptase reversa (Gibco-BRL). As Reações em Cadeia da Polimerase foram desenvolvidas no termociclador de temperatura para a amplificação, composta por um ciclo de 42°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos e 5°C por 5 minutos. Depois da transcrição, os cDNA foram armazenados à -20°C .

3.5.3 RT-PCR

Os DNA complementares foram amplificados com a utilização de primers específicos. A mistura de reação para a RT-PCR consistiu de 1 μ l de dNTPs (10mM), 5 μ l de tampão-PCR com 200mM de Tris-HCl (pH 8,4) e 500 mM de KCl (10X), 1,5 μ l de cloreto de magnésio (50mM), 0,5 μ l de enzima *Taq* polimerase (5U/ μ l) (Gibco-BRL), 1 μ l de cada *primer*, 1 μ l de cada DNA complementar e água estéril apirogênica (*Braun*) para complementar o volume total de 50 μ l. Depois de adicionar a mistura de reação, os cDNA foram submetidos às etapas de desnaturação, pareamento dos *primers* e polimerização em termociclador de temperatura, compostos de ciclos distintos para cada alvo, especificados na Tabela 4 (em anexo). Os produtos obtidos da amplificação foram separados em gel de poliacrilamida (7%) ou agarose (1,5%) contendo brometo de etídio (0,2 μ g/ml) em tampão Tris-acetato/EDTA (TAE) 1X e visualizados sob luz ultravioleta.

3.6 DOSAGEM DE CITOCINAS

Após a cultura de células por 72 horas, na presença ou não de diversos estímulos, o sobrenadante foi coletado e aliqotado para dosagem de IFN- γ através da técnica de ELISA (Duoset, Genzyme, R&D). Os resultados foram expressos em pg/ml de acordo com a curva padrão.

3.7 DOSAGEM DE NITRATO E NITRITO

Para a determinação da concentração de nitrato se fez necessário à redução do mesmo com a utilização de cultura da bactéria *Pseudomonas oleovorans*. A cultura bacteriana foi utilizada na proporção de 1/20 em meio DMEM (100µl) e incubada à 37°C juntamente com 100µl dos plasmas por 90 minutos. Após este período as amostras foram centrifugadas a 25°C/ 2000g(3000rpm) por 5 minutos para ser dosado nitrito nos sobrenadantes.

A produção de NO foi determinada através do método de Griess (DING et al., 1988), quantificando-se nitrito presente nos sobrenadantes. A curva padrão (1-100µM) foi realizada utilizando solução 0,1M de nitrito de sódio (NaNO₂) (Sigma, S-2252) diluída em RPMI, seguida de diluições seriadas (1:2), distribuídos em triplicatas, em placas de 96 poços. A revelação foi realizada através da adição de reagentes à base de sulfanilamida (Sigma, S-9251) a 1% em 30% de ácido acético e N-(1-naftil) etil-enediamina (NEED) (Sigma, S-9125) a 0,1% em 60% de ácido acético, na proporção de 1:2. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, no comprimento de onda 570 nm e os resultados analisados no *software Softmax PRO 3.0*.

3.8 ANÁLISE DE DADOS

Para as análises estatísticas dos resultados obtidos nos experimentos de linfoproliferação e citometria de fluxo utilizamos o test *t* de *Student*, comparando os dados provenientes dos indivíduos assintomáticos, pacientes e controles normais, bem como das amostras estimuladas e não estimuladas *in vitro*, tendo como valor estatisticamente significativo $p < 0.05$.

Nos experimentos de RT-PCR semi-quantitativos buscou-se uma linearidade entre os cDNA e os produtos finais do PCR através de diluições seriadas e otimização dos componentes da mistura de reação para a RT-PCR. A quantificação das bandas foi realizada através do programa *NIH image*.

A análise estatística dos dados e a elaboração dos gráficos deste estudo foram realizados utilizando-se o programa *GraphPad - Prism 3.0* (*GraphPad software*, San Diego, CA).

4 RESULTADOS

4.1 EXPRESSÃO *ex vivo* DE MOLÉCULAS RELACIONADAS COM A APOPTOSE EM INDIVÍDUOS INFECTADOS POR HTLV-I

4.1.1 Presença de mRNA de iNOS

Visto que, em ATL foi descrito a presença de iNOS e seu papel anti-apoptótico buscamos verificar sua presença nos indivíduos infectados por HTLV-I comparando pacientes com HAM/TSP e assintomáticos. A presença do mRNA de iNOS foi verificada em PBMC *ex vivo* de indivíduos infectados por HTLV-I (Figura 2) através da extração de RNA e utilização da técnica de RT-PCR qualitativo. Como controle positivo foi amplificado o cDNA de iNOS e a amplificação do β -2 microglobulina foi utilizado como controle interno, um polipeptídeo pequeno associado às proteínas MHC de classe I e expresso constitutivamente em todos os tipos celulares. Os resultados demonstraram uma expressão maior de iNOS nos assintomáticos quando comparados aos pacientes portadores de HAM/TSP.

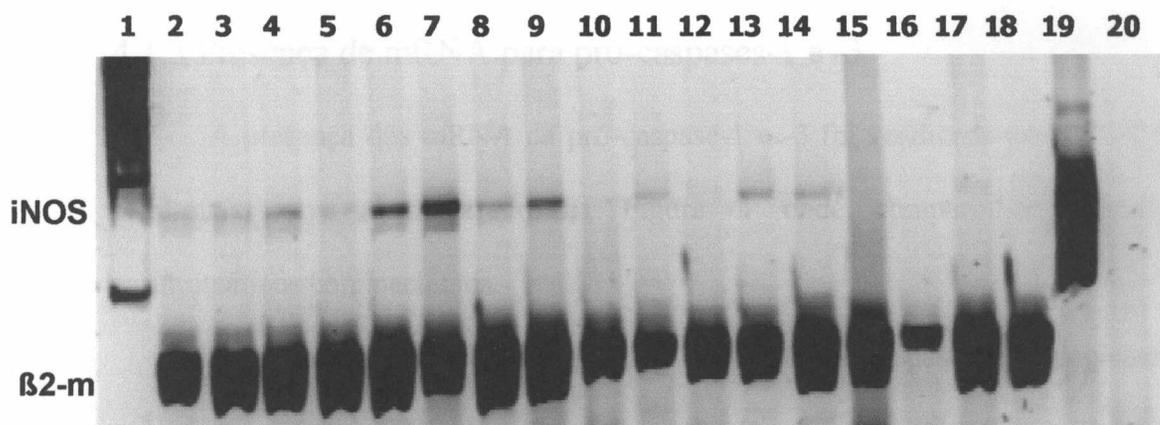


Figura 2. RT-PCR qualitativo para mRNA de iNOS em PBMC ex vivo de indivíduos infectados por HTLV-I. Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%) dos produtos do RT-PCR amplificados com primers específicos para iNOS (259bp) e β -2m (165bp), a coluna 1 é equivalente aos marcadores de pares de base, colunas 2-9 indivíduos assintomáticos, 10-18 pacientes com HAM/TSP, 19 controle positivo (cDNA de iNOS) e 20 controle negativo.

4.1.2 Presença de mRNA de Fas e FasL

De acordo com os dados da Figura 3 pudemos verificar uma presença aumentada de mRNA de Fas e FasL nos assintomáticos, com exceção do paciente número 06 (coluna 15).

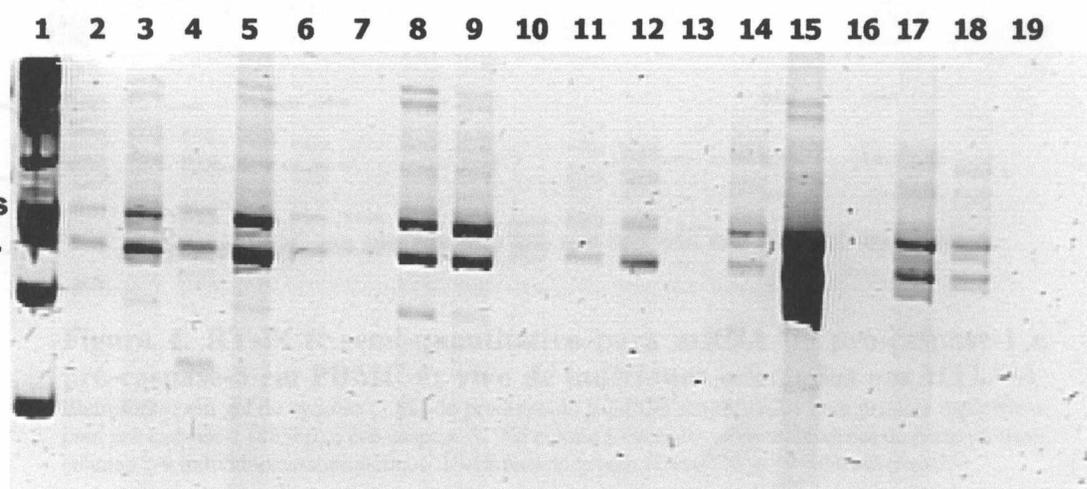


Figura 3. RT-PCR semi-quantitativo para mRNA de Fas e FasL em PBMC ex vivo de indivíduos infectados por HTLV-I. Eletroforese em gel de poliacrilamida (7%) dos produtos do RT-PCR amplificados com primers específicos para Fas (496bp) e FasL (447bp), a coluna 1 é equivalente ao marcador de pares de base, colunas 2-9 indivíduos assintomáticos, 10-18 pacientes com HAM/TSP e coluna 19 controle negativo.

4.1.3 Presença de mRNA para pró-caspases-1 e -3

A presença dos mRNA da pró-caspase-1 e -3 foi verificada por RT-PCR semi-quantitativo demonstrado na Figura 4 onde comparou-se também assintomáticos com pacientes.

Estes dados demonstram uma maior expressão de caspase-1 nos pacientes portadores de HAM/TSP do que nos assintomáticos, e em relação a caspase-3 pudemos observar o inverso. Ainda com estes resultados pudemos verificar uma expressão de caspase-1 e -3 semelhante à expressão de Fas e FasL no paciente 06, o qual apresentou mais mRNA para ambas as caspases quando comparado aos demais pacientes.

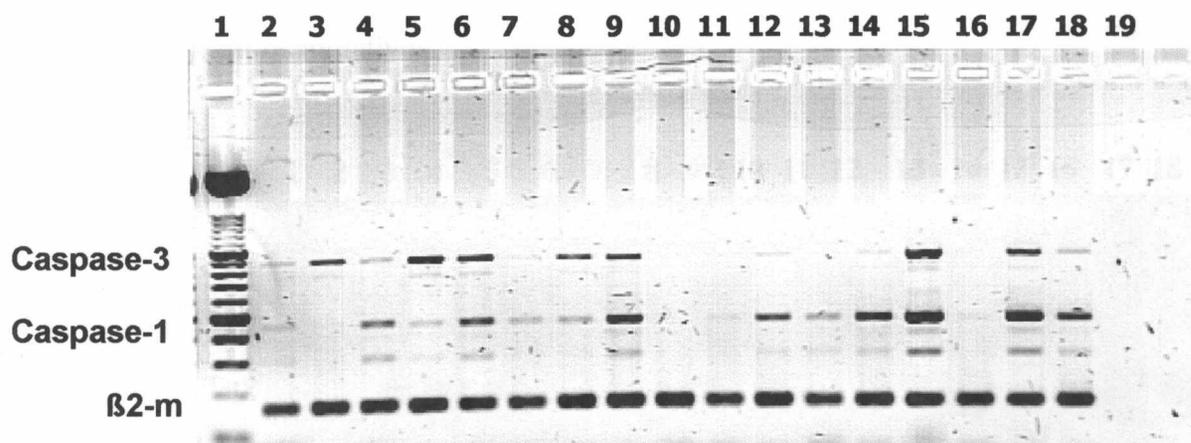


Figura 4. RT-PCR semi-quantitativo para mRNA de pró-caspase-1 e pró-caspase-3 em PBMC ex vivo de indivíduos infectados por HTLV-I. Eletroforese em gel de agarose (1 %) do produtos do RT-PCR amplificados com primers específicos para pró-caspase-1 (485bp) e pró-caspase-3. Na coluna 1 encontra-se os marcadores de pares de base, colunas 2-9 indivíduos assintomáticos, 10-18 pacientes com HAM/TSP e 19 controle negativo.

4.1.4 Expressão da proteína viral Tax (modulação da transcrição viral)

De acordo com os dados da literatura em que linhagens de células T transfectadas com Tax (principal fator transativador do HTLV-I) mostram ambos efeitos pró e anti-apoptóticos a depender do estímulo empregado, buscamos verificar a presença da proteína viral Tax em PBMC ex vivo de indivíduos assintomáticos e pacientes com HAM/TSP correlacionando-a com nossos dados anteriores (Figuras 2-4), já que esta proteína atua indiretamente na indução da transcrição do genoma viral (proteína p40) e de diversos genes celulares.

Na Figura 5 observamos que a expressão de Tax ex vivo se apresentou muito variável tanto em assintomáticos quanto nos pacientes com HAM/TSP, não havendo correlação com os dados da presença de iNOS, Fas e FasL e caspases ex vivo. Porém, vale ressaltar que os PCR realizados foram qualitativos (iNOS) ou semi-quantitativos.

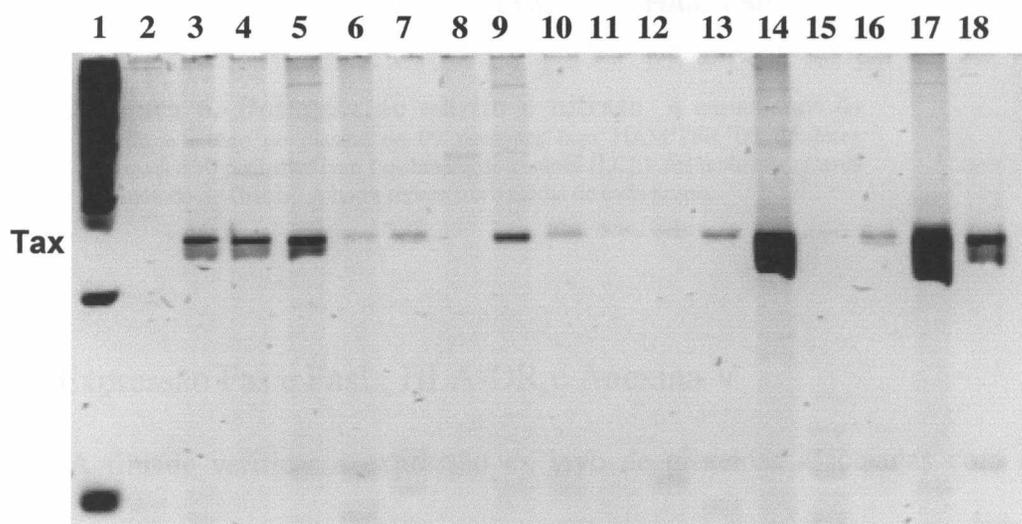


Figura 5. RT-PCR qualitativo para mRNA de Tax em PBMC ex vivo de indivíduos infectados por HTLV-I. Eletroforese em gel de poliácridamida (7%) dos produtos do RT-PCR amplificados com primers específicos para Tax (159bp); a coluna 1 é equivalente ao marcador de pares de base, colunas 2-9 indivíduos assintomáticos e 10-18 pacientes com HAM/TSP.

4.1.5 Dosagem de nitrito e nitrato

O nitrito e nitrato foram quantificados no plasma, como uma medida da atividade enzimática da iNOS *ex vivo*. Pudemos então, verificar na Figura 6 a presença de níveis significativamente mais elevados nos pacientes ($p = 0,02$) (test *t* de *Student* não pareado) do que nos doadores normais e portadores de Leishmaniose cutânea, os quais serviram como controles negativos.

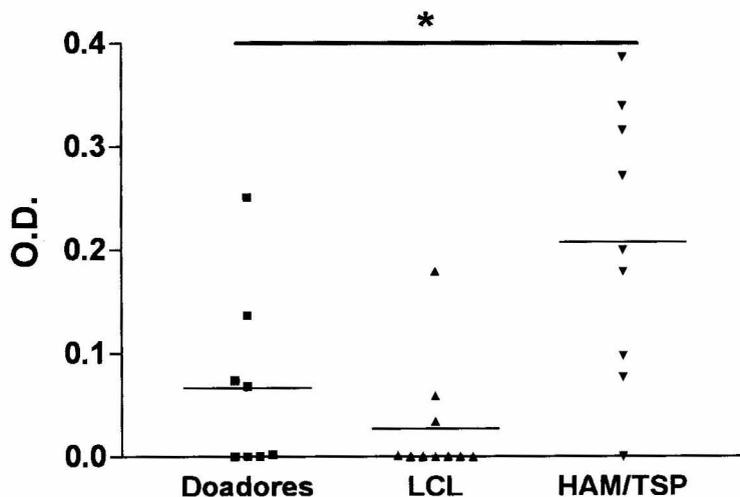
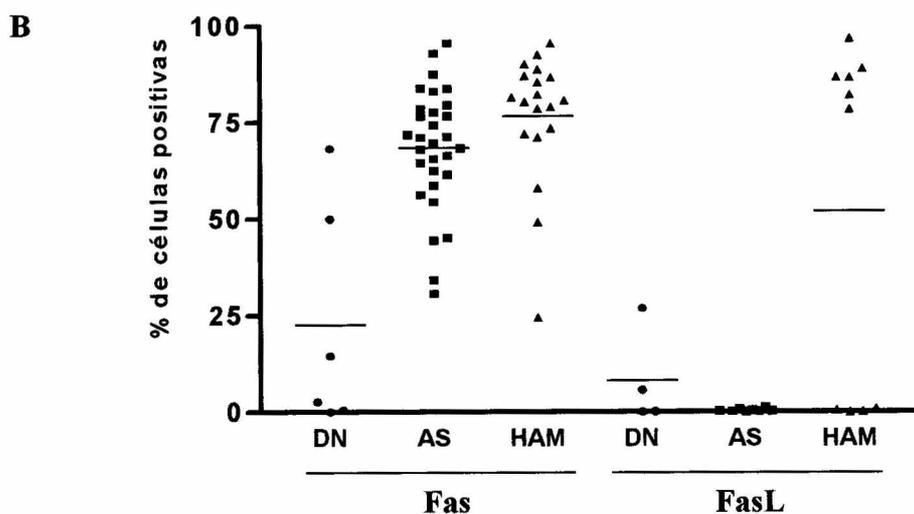
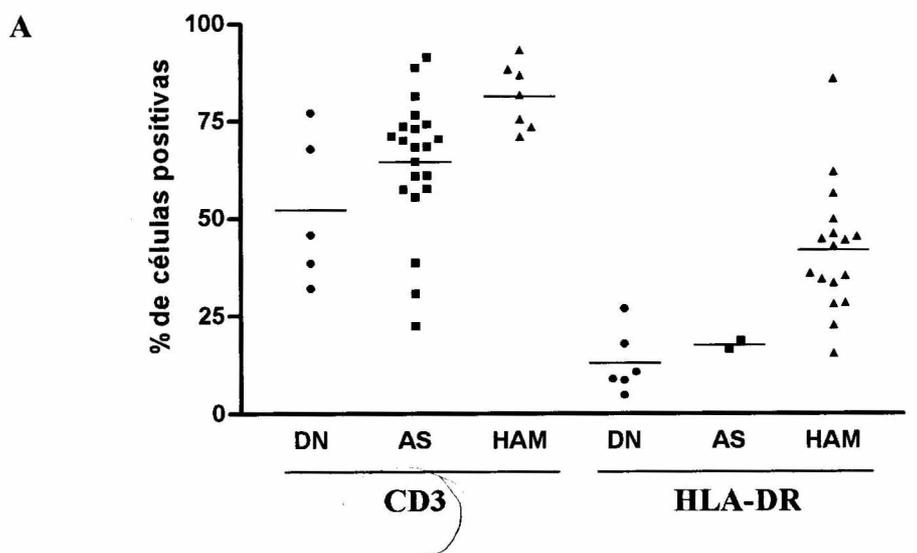


Figura 6. Dosagem de nitrito e nitrato. A quantificação do nitrito e nitrato no plasma de 09 pacientes com HAM/TSP, 08 doadores normais e 10 pacientes com Leishmaniose cutânea (LCL) foi realizada através do método de Griess. A barra representa a média de cada grupo.

4.1.6 Expressão Fas e FasL, HLA-DR e Anexina V

A fim de verificar a expressão *ex vivo* de proteínas associadas com a ativação celular e apoptose avaliamos através da citometria de fluxo a expressão de CD3, HLA-DR, Fas e FasL e marcação com anexina V em pacientes com HAM/TSP, assintomáticos e doadores normais. Na Figura 7 observamos um

aumento gradual na porcentagem de linfócitos, tal como na sua ativação (DN-AS-HAM/TSP) (Figura 7A) e, em relação à presença de proteínas relacionadas com a apoptose, verificamos o mesmo gradiente para o Fas, enquanto que o FasL teve um aumento nos pacientes quando comparado com doadores normais (Figura 7B) e a marcação com anexina V apresentou-se em níveis muito baixos corroborando com os dados na literatura (Figura 7C).



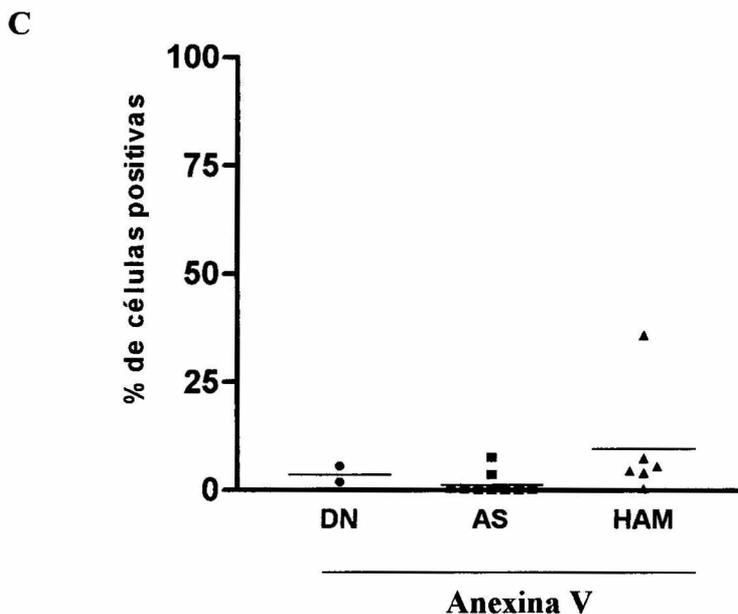


Figura 7. Expressão ex vivo de moléculas associadas com ativação celular e apoptose em PBMC de indivíduos infectados por HTLV-I. Porcentagem de células positivas para CD3 e HLA-DR (A), Fas e FasL (B) e anexina V (C) após marcação de superfície e análise por Citometria de fluxo em assintomáticos (AS), pacientes (HAM/TSP) e doadores normais (DN). A barra representa a média de cada grupo.

4.2 ESTUDO DO EFEITO DO IFN- α , - β e L-NMMA NA PROLIFERAÇÃO, APOPTOSE E TRANSCRIÇÃO VIRAL *in vitro*

4.2.1 Avaliação da proliferação celular espontânea em PBMC

Para comparar os efeitos do IFN e do inibidor de iNOS (L-NMMA) realizamos ensaios de linfoproliferação espontânea ou induzida por *anti*-CD3 em indivíduos assintomáticos, pacientes com HAM/TSP e doadores normais. Nas Figuras 8A e B estão demonstrados os efeitos do IFN- β e L-NMMA na linfoproliferação espontânea em indivíduos assintomáticos e pacientes HAM/TSP. Na Figura 8A pudemos observar um efeito inibitório para todos os estímulos

testados em alguns indivíduos assintomáticos, embora apenas a inibição pelo L-NMMA tenha alcançado significância estatística ($p=0,028$). Em relação aos pacientes com HAM/TSP (Figura 8B), o IFN- α e o L-NMMA mostraram um modesto, mas não significativo efeito inibitório enquanto que o IFN- β apresentou um marcante efeito anti-proliferativo ($\cong 70\%$, $p<0,0001$) (test t de *Student* pareado).

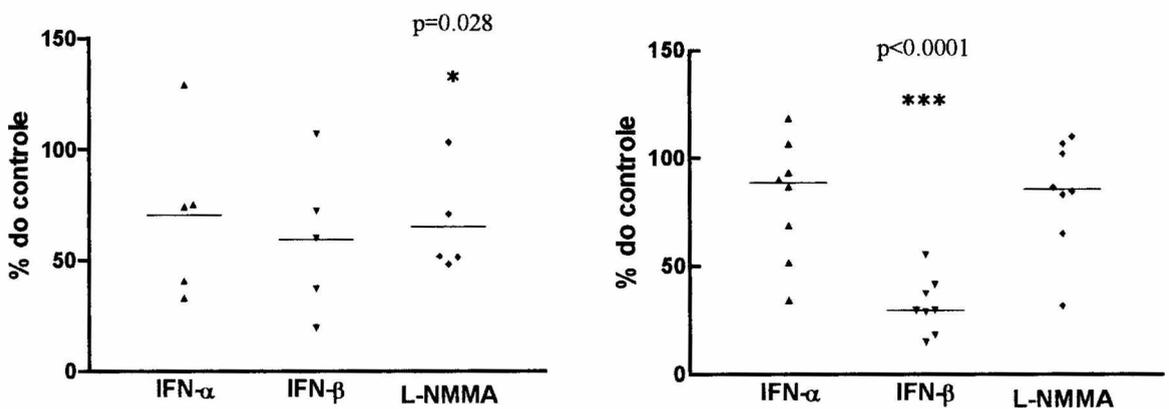


Figura 8. Efeito inibitório do IFN- α , IFN- β e L-NMMA na linfoproliferação espontânea. PBMC de indivíduos assintomáticos (A) e pacientes com HAM/TSP (B) foram cultivados por 5 dias na presença de 10^3 U/ml de IFN- α - β e 2mM de L-NMMA. A linfoproliferação foi avaliada através da incorporação de 3 H timidina e os resultados foram expressos como a porcentagem de incorporação de 3 H timidina deduzida das células controle (células não estimuladas).

De acordo com estes resultados continuamos a investigar o efeito do IFN- β nos pacientes HAM/TSP visto que, os interferons são caracterizados pelos seus efeitos anti-proliferativos, antivirais e pró-apoptóticos. Formulamos então, três hipóteses para explicar a diminuição na incorporação de 3 H timidina causada pelo IFN- β : 1. efeito direto anti-proliferativo; 2. efeito pró-apoptótico, podendo ser uma consequência de uma proliferação exacerbada (AICD) e 3. efeito na transcrição viral, já que a proteína Tax é a principal molécula reguladora da proliferação nas células infectadas por HTLV-I.

4.2.2 Efeito do IFN- β na proliferação espontânea e induzida em PBMC de pacientes com HAM/TSP e doadores normais

A fim de avaliar se o efeito inibitório do IFN- β na incorporação de ^3H timidina seria devido a uma ação direta anti-proliferativa do mesmo, verificamos os efeitos de diferentes concentrações de IFN- β na proliferação induzida por anti-CD3 em doadores normais. Na Figura 9 podemos observar que a dose de 10^3U/ml constitui-se na dose ótima, onde o IFN- β mostrou seu efeito antiproliferativo, enquanto que uma dose maior de 10^4U/ml se mostrou tóxica para a célula como já havia sido mostrado por Van Weyenbergh e colaboradores em teste de viabilidade com Trypan blue (VAN WEYENBERGH et al., 1998). Por outro lado, o IFN- α não parecia possuir efeito antiproliferativo, pois nem mesmo em doses elevadas (10^4U/ml) ele foi capaz de inibir a proliferação induzida por *anti-CD3* (dados não mostrados).

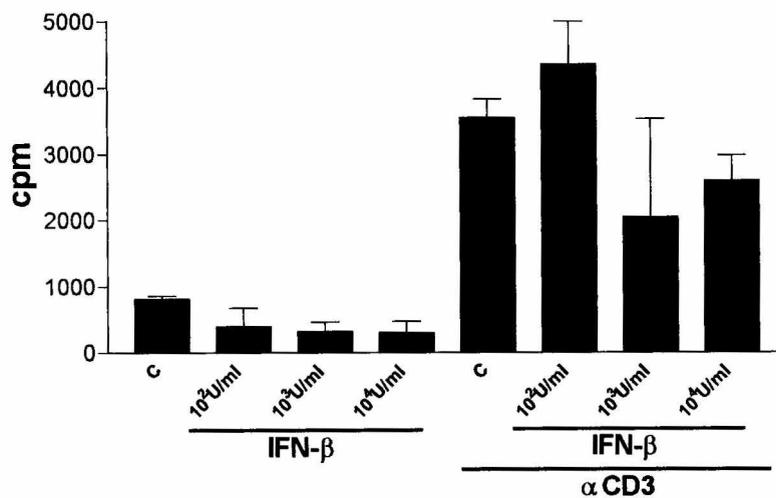


Figura 9. Curva dose do efeito do IFN- β na linfoproliferação espontânea e induzida por anti-CD3. PBMC de doadores normais (n=03) foram cultivados por 5 dias na presença ou ausência de $0,2\ \mu\text{g/ml}$ de anti-CD3 e diferentes doses de IFN- β . A linfoproliferação foi avaliada através da incorporação de ^3H timidina e os resultados estão apresentados em cpm.

Tendo estabelecida a dose ótima do IFN- β , buscamos verificar seu efeito na linfoproliferação espontânea e induzida por *anti*-CD3 em pacientes com HAM/TSP (Figura 10). Como relatado na Figura 10A, o IFN- β apresentou um efeito antiproliferativo marcante e a estimulação com *anti*-CD3 induziu uma surpreendente diminuição da proliferação celular nos três pacientes testados. Em experimentos posteriores (Figura 10B) verificamos um efeito proliferativo do *anti*-CD3 em nove dos dez pacientes avaliados, aparentemente contradizendo o resultado obtido anteriormente. A dose de *anti*-CD3 utilizada em todos os experimentos foi considerada sub-ótima quando testamos em paralelo doses elevadas deste estímulo (dados não mostrados).

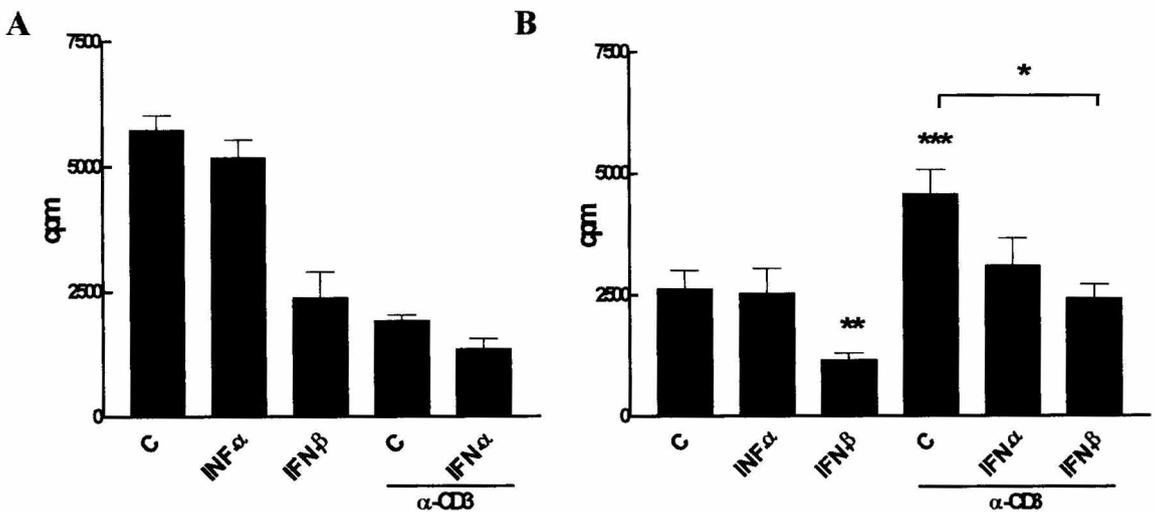


Figura 10. Efeito inibitório do IFN- β e do *anti*-CD3 na linfoproliferação em pacientes HAM/TSP. PBMC de pacientes HAM/TSP (A-n=03 e B-n=08) foram cultivados por 5 dias na presença de 10^3 U/ml de IFN- α / β e $0,2\mu\text{g/ml}$ de *anti*-CD3. A linfoproliferação foi avaliada através da incorporação de ^3H timidina e os resultados apresentados em cpm (counters per minute).

Em experimentos com doadores normais, também encontramos dois grupos distintos em relação a ação do estímulo com *anti*-CD3 e IFN- β na linfoproliferação como demonstrado na Figura 11. No primeiro grupo verificamos uma sinergia ao adicionarmos *anti*-CD3 juntamente com IFN- β proporcionando um aumento na linfoproliferação em relação aos dois tratamentos sozinhos e um outro grupo no qual o IFN- β causou uma diminuição na proliferação celular induzida por *anti*-CD3.

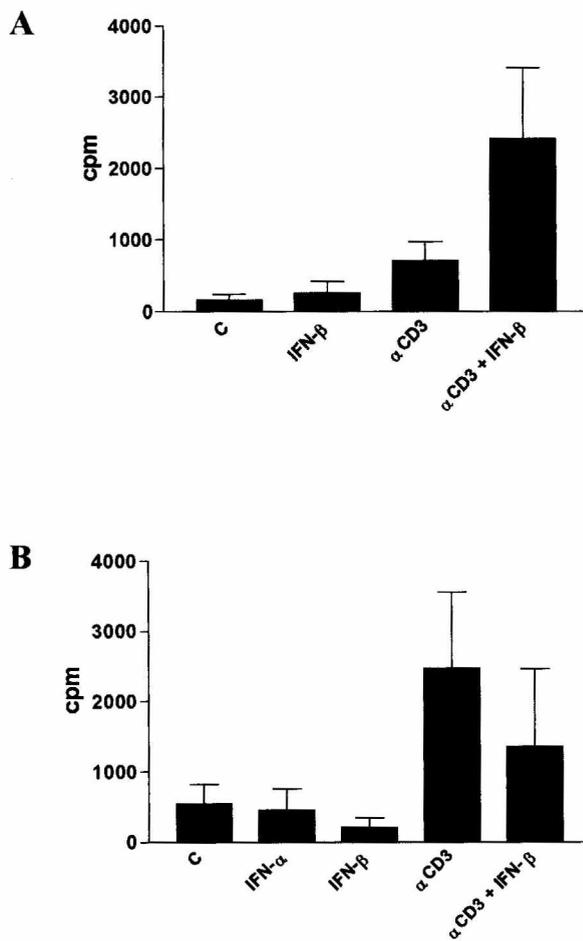


Figura 11. Efeito do IFN- β e do *anti*-CD3 na linfoproliferação em doadores normais. PBMC de doadores normais (A-n=03 e B-n=03) foram cultivados por 5 dias na presença de 10^3 U/ml de IFN- α /- β e $0,2\mu$ g/ml de *anti*-CD3. A linfoproliferação foi avaliada através da incorporação de 3 H timidina e os resultados apresentados em cpm (counters per minute).

4.2.3 Efeito do IFN- β na blastogênese induzida por *anti*-CD3 em Pacientes com HAM/TSP

Para verificar se os dados sobre a incorporação de ^3H timidina, apresentados acima, estariam refletindo uma proliferação linfocitária, observamos através do citômetro de fluxo as características morfológicas das células de pacientes com HAM/TSP estimuladas com IFN- β e *anti*-CD3. Pudemos então, observar a presença de mudanças morfológicas característica da linfoproliferação, tanto na proliferação espontânea (Figura 12A) quanto na induzida por *anti*-CD3 (Figura 12C) e que, em ambos os casos, o IFN- β reduziu a presença de linfoblastos (Figuras 12B e D).

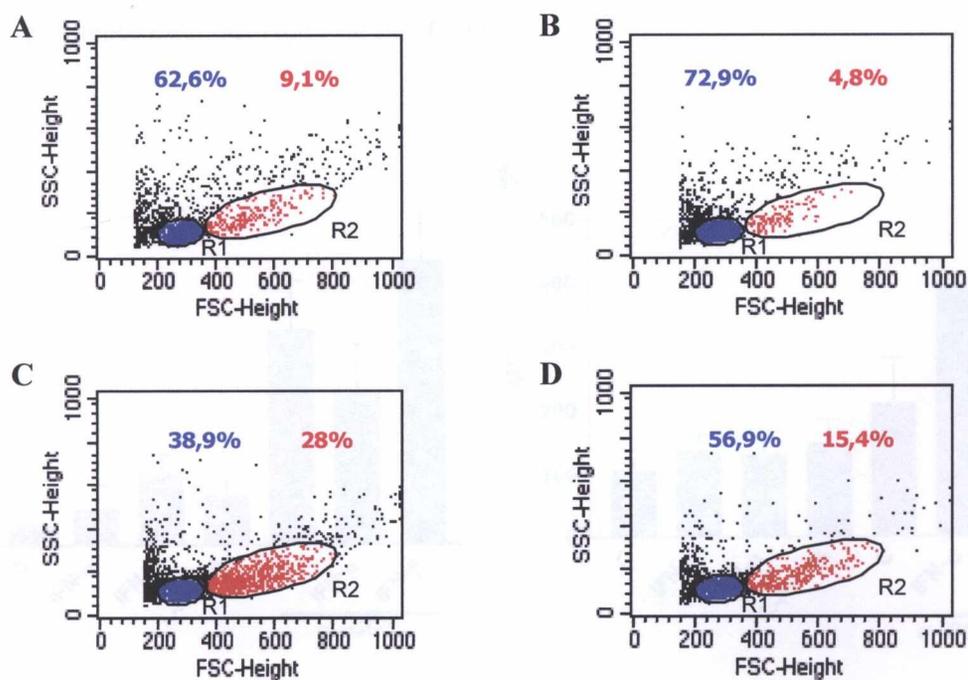


Figura 12. Efeito do IFN- β na blastogênese induzida por *anti*-CD3 em Pacientes com HAM/TSP. Imagem densitométrica de populações celulares definidas por fluorescência inespecífica, seguindo-se a definição dos parâmetros de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) e seleção de linfócitos na região denominada *gate* (R1 e R2). Células controle (A), células cultivadas com 10^3U/ml de IFN- β (B), com $0,2\mu\text{g/ml}$ de *anti*-CD3 (C) e cultivadas com IFN- β e *anti*-CD3 (D).

4.2.4 Avaliação dos efeitos do IFN- α , - β e L-NMMA na expressão de moléculas relacionadas com a apoptose em pacientes com HAM/TSP

A possível atividade pró apoptótica dos IFN e do inibidor de iNOS foi investigada através de citometria de fluxo, onde pudemos observar nas Figuras 13A e B a expressão de moléculas relacionadas com a apoptose em PBMC de pacientes HAM/TSP. Os IFN- α , IFN- β e o L-NMMA induziram um modesto, mas não significativo aumento na expressão de Fas/CD95 e marcação com anexina V em contraste ao estímulo com *anti*-CD3, o qual aumentou a marcação com anexina V e expressão de Fas/CD95 na maioria dos pacientes. O IFN- β possui uma discreta atividade pró-apoptótica nestes pacientes sendo esta, aparentemente, independente de modulação de Fas/CD95.

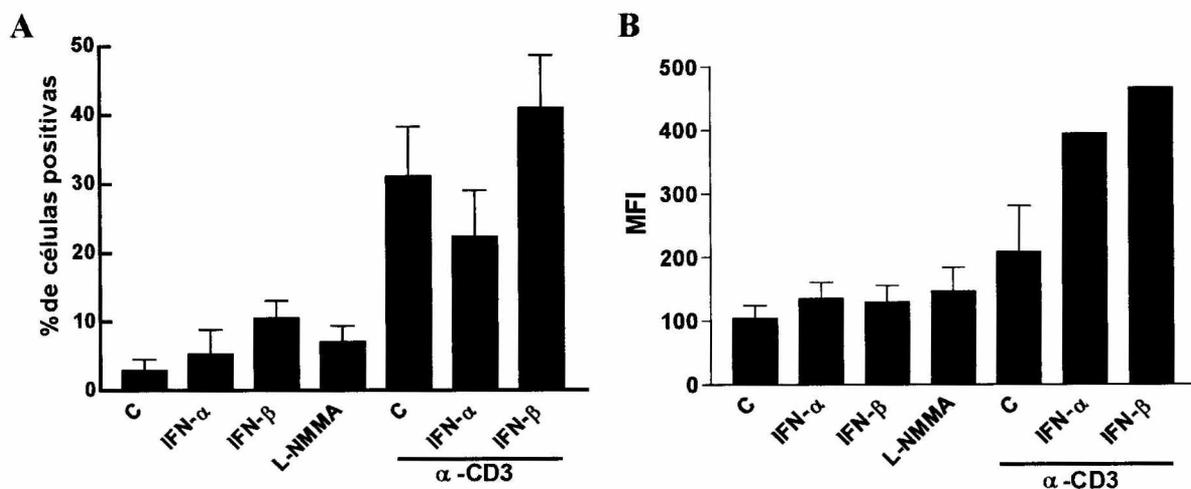


Figura 13. Expressão in vitro de moléculas relacionadas com a apoptose. Citometria de fluxo para determinar a marcação com anexina V (A) e a expressão de CD95 (B) em PBMC de pacientes HAM/TSP. Os resultados para a expressão de CD95 estão representados em MFI (intensidade mediana de fluorescência).

4.2.5 Avaliação dos efeitos do IFN- β e estimulação com *anti*-CD3 na modulação da transcrição viral em pacientes com HAM/TSP

Nesta etapa do trabalho buscamos avaliar os efeitos do IFN- β e estimulação com *anti*-CD3 na transcrição do gene pX (proteína Tax) viral correlacionando-os com os efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos destes tratamentos, visto que, o IFN- β mostrou-se altamente antiproliferativo em todos os pacientes testados e a estimulação com *anti*-CD3 diminuiu a linfoproliferação em um grupo distinto de pacientes. Em relação a apoptose o IFN- β induziu um modesto aumento na expressão de CD95 e marcação com anexina V na maioria dos pacientes, em contraste à estimulação com *anti*-CD3. Porém, como visto na Figura 14, o efeito antiproliferativo do IFN- β e do *anti*-CD3 ou dos dois juntos não resultou numa diminuição da transcrição viral, já que os níveis dos RNA para o gene pX permaneceram inalterados na análise dos PCR.

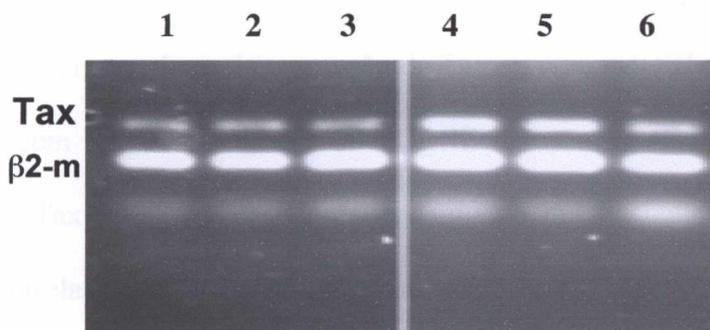


Figura 14. RT-PCR para mRNA da Tax em PBMC in vitro de pacientes HAM/TSP. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de produtos do RT-PCR amplificados com primers específicos para Tax (159bp) e β -2m (165bp). As colunas de 1-3 são equivalentes ao controle, IFN- β + *anti*-CD3 e *anti*-CD3 respectivamente, do paciente 01 e as colunas de 4-6 são equivalentes ao controle, IFN- β + *anti*-CD3 e *anti*-CD3 respectivamente, do paciente 02.

5 DISCUSSÃO

Inicialmente buscamos avaliar a expressão *ex vivo* de mRNA iNOS em indivíduos assintomáticos e pacientes com HAM/TSP e seu possível papel anti-apoptótico, visto que o mesmo já havia sido demonstrado em células de linhagens infectadas por HTLV-I, em leucemia de células T no adulto (ATL) e em leucemia de células B (BCLL) (MORI et al., 1999; SONOKI et al., 1999; ZHAO et al., 1998). Nossos resultados demonstraram, pela primeira vez, a expressão de mRNA iNOS em indivíduos assintomáticos que embora tenha se mostrado bastante variável foi maior que a expressão ausente nos pacientes (Figura 2).

De acordo com os dados de SONOKI et al. (1999) e MORI et al. (1999), a iNOS foi expressa constitutivamente em linhagens de células T transformadas *in vitro* (infectadas por HTLV-I) e células derivadas de ATL, mas não em doadores normais. A intensidade dos produtos de RT-PCR de iNOS em ATL não se correlaciona com os níveis da expressão de Tax *ex vivo* (MORI et al., 1999) o que corrobora com nossos resultados onde verificamos uma expressão variável de mRNA de Tax tanto em assintomáticos quanto em pacientes HAM/TSP não havendo correlação com os dados da presença de iNOS (Figura 5).

Em relação à atividade anti-apoptótica da iNOS, demonstramos que o L-NMMA foi capaz de diminuir significativamente a incorporação de ³H timidina em ensaios de proliferação celular nos indivíduos assintomáticos, enquanto que nos pacientes o L-NMMA não mostrou efeito antiproliferativo significativo (Figura 8). Estes dados indicam um possível efeito antiproliferativo e/ou pró-

apoptótico do inibidor de iNOS, estando este relacionado com os dados do RT-PCR onde houve uma expressão maior do mRNA da iNOS em assintomáticos do que em pacientes HAM/TSP. Porém, somente em dois dos três assintomáticos avaliados, onde o L-NMMA mostrou inibição da proliferação celular houve uma quantidade maior de mRNA para iNOS, enquanto que o indivíduo assintomático número 06 mostrou expressão de mRNA para iNOS aumentada, mas não apresentou nenhum efeito na diminuição de linfoproliferação após estímulo com L-NMMA.

Para verificar se a iNOS possui um efeito anti-apoptótico em células T de pacientes HAM/TSP, observamos o efeito do inibidor de iNOS na marcação com anexina V e expressão de CD95. Pudemos então, constatar que o L-NMMA não modificou significativamente a marcação com anexina V e expressão de CD95 (Figura 13). Como medida da atividade enzimática da iNOS *ex vivo* quantificamos nitrito e nitrato no plasma, onde se verificou que os pacientes mostraram níveis significativamente mais elevados ($p < 0,05$, $n=9$) em relação aos doadores normais e pacientes com Leishmaniose cutânea (Figura 6). Porém ainda falta dosar nitrato e nitrito no plasma dos assintomáticos para podermos tirar uma conclusão definitiva sobre o papel da iNOS na patologia. Finalmente, detectamos de maneira esporádica a presença de nitrito nos sobrenadantes das células mononucleares *in vitro* sem apresentar diferença entre os grupos de assintomáticos, pacientes HAM/TSP e doadores normais.

Buscamos, então, avaliar a expressão *ex vivo* de outras moléculas possivelmente implicadas no processo apoptótico em indivíduos infectados por HTLV-I. Observamos uma presença aumentada de mRNA de Fas e FasL nos

assintomáticos e no paciente número 06 (Figura 3), o que poderia estar correlacionado com o quadro clínico da doença recente levando em consideração que se tratava de um paciente jovem (36 anos), visto que este vírus é capaz de desencadear diferentes formas clínicas somente após longos períodos de incubação, geralmente acima de 30 anos (MANNIS et al., 1999). Em relação à presença de mRNA para pró-caspase -1 e -3, verificamos uma expressão maior de caspase-1 nos pacientes HAM/TSP do que nos assintomáticos e em relação a caspase-3 pudemos observar o inverso (Figura 4). Isto sugere uma predisposição maior dos indivíduos assintomáticos a sofrer apoptose do que os pacientes e um possível efeito pró-inflamatório maior nos pacientes, visto que a pró-caspase-3 é uma caspase efetora na cascata da apoptose (KOLENKO et al., 1999) e a pró-caspase-1, embora possua também efeito pró-apoptótico, é uma caspase com efeitos pró-inflamatórios (FANTUZZI & DINARELLO, 1999). No que diz respeito ao paciente 06, pudemos verificar uma expressão de caspase-1 e -3 fortemente aumentada, semelhante à expressão de Fas e FasL.

Posteriormente, verificamos a expressão ex vivo das proteínas associadas com a ativação celular e apoptose através da citometria de fluxo. Nossos resultados demonstram, pela primeira vez, a expressão elevada de Fas na superfície celular, tanto em pacientes HAM/TSP quanto em assintomáticos, quando comparado com doadores normais, sendo esta mais expressiva nos pacientes (Figura 7B). Nossos dados concordam com os dados já publicados de detecção de Fas solúvel (INOUE et al., 1997; SAKAI et al., 1999). Entretanto pudemos observar este mesmo padrão de expressão (pacientes > assintomáticos > doadores normais) para outro marcador de ativação linfocitária (HLA-DR) (Figura

7A), o que corresponde com os dados de AL FAHIN et al. (1999) e NAGAI et al. (2001). Em relação ao FasL não foi possível tirar conclusões definitivas, pois foram utilizados dois anticorpos diferentes. Inicialmente foi realizada uma marcação indireta em todos os assintomáticos e parte dos pacientes que apresentaram níveis muito baixos de FasL na superfície. Posteriormente foi utilizada uma marcação direta em seis pacientes e quatro doadores, os quais mostraram uma maior expressão de FasL (Figura 7B). KAWAHIGASHI et al. (1998) demonstraram que a expressão de mRNA para FasL estava aumentada em pacientes HAM/TSP e ausente em assintomáticos e SAKAI et al. (1999) demonstraram níveis elevados de FasL solúvel no soro de pacientes com HAM/TSP em relação aos controles (doadores normais).

A presença aumentada de Fas e FasL em quase todos os pacientes contrasta com nossos dados de expressão de mRNA. Esta diferença talvez se deva a alterações nos mecanismos celulares transcricionais e pós-traducionais ou devido à diferença na clivagem de Fas e FasL da membrana, os convertendo à forma solúvel. Finalmente, a marcação com anexina V mostrou-se baixa nos três grupos (Figura 7C), estando correlacionada com os dados de FURUKAWA et al. (2000A), confirmando que não existe morte celular programada *ex vivo* na HAM/TSP.

Numa segunda etapa, buscamos estudar os mecanismos moleculares implicados na apoptose *in vitro* em indivíduos infectados por HTLV-I. Primeiramente, observamos que em indivíduos assintomáticos não houve um efeito inibitório estatisticamente significativo dos interferons α e β na

incorporação de ^3H timidina. Nos pacientes HAM/TSP, o IFN- α não mostrou efeito inibitório significativo, enquanto que o IFN- β apresentou um efeito anti-proliferativo marcante ($\cong 70\%$ $p < 0,0001$) (Figura 8). Estes dados sugerem um possível efeito anti-proliferativo do IFN- β , correlacionado ou não com uma atividade pró-apoptótica. De acordo com estes resultados, continuamos a investigar os efeitos dos interferons nos pacientes HAM/TSP com a finalidade de elucidar se o seu mecanismo de ação estaria relacionado a um efeito direto antiproliferativo, um efeito pró-apoptótico, podendo ser uma consequência de uma proliferação exacerbada (AICD) ou um efeito na transcrição viral, já que a proteína Tax é a principal molécula reguladora da proliferação nas células infectadas por HTLV-I.

Em pacientes HAM/TSP, o IFN- β apresentou um marcante efeito inibitório na incorporação de ^3H timidina, sendo esta, apenas uma estimativa primitiva de linfoproliferação. Porém, a estimulação com anti-CD3 induziu uma diminuição surpreendente na incorporação de ^3H timidina em três dos quatro primeiros pacientes testados, provavelmente por desencadear a morte celular induzida por ativação (AICD) (Figura 10A). Em experimentos posteriores verificamos um efeito estimulador do *anti-CD3* em oito dos dez pacientes avaliados, aparentemente contradizendo o resultado obtido anteriormente (Figura 10B). Na verdade, evidenciamos dois grupos distintos de pacientes no que diz respeito à incorporação de ^3H timidina induzida por *anti-CD3*: um grupo que já apresentava uma incorporação espontânea elevada (> 5000 cpm); e um segundo grupo com incorporação espontânea menos expressiva (entre 800 a 4000 cpm).

Quando analisamos, em paralelo, estas mesmas células no citômetro de fluxo, pudemos observar a presença de linfoblastos, sendo esta uma característica de proliferação de células T estimuladas via receptor antigênico (Figura 12). Estes mesmos blastos não foram observados em culturas não estimuladas com *anti-CD3*, indicando que a incorporação de ^3H timidina de forma espontânea não parece ser um processo de blastogênese clássico *in vitro*, pelo menos morfológicamente. Esta capacidade proliferativa das células infectadas é decorrente de mecanismos moleculares distintos, provavelmente desencadeado pela proteína Tax.

Experimentos com doadores normais não mostraram nenhuma diferença significativa na incorporação de ^3H timidina pelo IFN- β e IFN- α em relação ao controle, levando em consideração que a incorporação espontânea em doadores normais é muito baixa (< 1000 cpm). Porém, também encontramos dois grupos distintos em relação a ação do estímulo com *anti-CD3* e IFN- β na linfoproliferação. No primeiro grupo verificamos uma sinergia ao adicionarmos *anti-CD3* juntamente com IFN- β (Figura 11A), evidenciando a ausência de toxicidade na dose de IFN- β utilizada (10^3 U/ml). Num segundo grupo, o IFN- β causou uma diminuição na incorporação de ^3H timidina induzida por *anti-CD3* (Figura 11B) semelhante aos resultados encontrado nos pacientes, indicando uma ação anti-proliferativa do IFN- β .

Esta diferença de resposta proliferativa em relação ao estímulo com IFN- β pode ser devido a resposta imune de cada doador, variações genéticas, fatores nutricionais, presença de co-infecções, inflamações e outras patologias ou mesmo devido a ação diferenciada dos interferons ou tratamento prévio com vitamina c, a

qual se mostrou capaz de diminuir a linfoproliferação induzida por *anti*-CD3 *in vitro* em pacientes com HAM/TSP, assim como desencadear um efeito pró-apoptótico (marcação com anexina V) (pôster apresentado no Congresso da SBI, 2000 - em anexo).

De acordo com nossos resultados, os IFN- α e - β possuem atividades biológicas diferenciadas em relação ao seu efeito antiproliferativo, onde o IFN- β se mostra eficaz na diminuição da linfoproliferação e o IFN- α , na maioria dos casos, não apresenta nenhuma atividade inibitória. Levando-se em conta que estes interferons do tipo I se ligam ao mesmo receptor celular e possuem efeitos pleiotrópicos em todos os tipos celulares, esta diferença entre eles poderia estar relacionada com uma diferença na dose utilizada. Realizamos então, experimentos de curva dose onde pudemos observar que as diferenças encontradas entre os IFN- α e - β não estão correlacionadas com a toxicidade da dose utilizada (Figura 9).

A possível atividade pró apoptótica dos IFN foi investigada através de citometria de fluxo, onde pudemos observar a expressão de moléculas relacionadas com a apoptose em PBMC de pacientes com HAM/TSP. O IFN- α e o IFN- β não foram capazes de induzir aumento significativo na expressão de Fas/CD95 e marcação com Anexina V, em contraste ao estímulo com *anti*-CD3 o qual aumentou tanto a expressão de Fas quanto a marcação com anexina V (Figura 13), além de ter induzido a fragmentação nuclear (dados não mostrados) na maioria dos pacientes. O IFN- β demonstrou possuir uma discreta atividade pró-apoptótica nestes pacientes sendo esta, aparentemente, independente de modulação de Fas/CD95, pois pudemos verificar sua atividade adicionando *anti*-Fas agonista e antagonista na cultura, onde nenhum dos dois foi capaz de modular

apoptose in vitro (dados não mostrados). Contudo, nossos resultados consistem com os dados da pesquisa realizada em células de sarcoma de Ewing, onde demonstrou-se que o IFN- β é mais anti-proliferativo e pró-apoptótico sendo capaz de induzir IRF-I (fator regulador de interferon-I) e potencializar a apoptose via caspase-7, em contraste ao IFN- α , o qual possui uma fraca atividade anti-proliferativa na ausência de atividade apoptótica in vitro (SANCÉAU et al., 2000).

Embora nossos dados estejam relacionados com os achados de SANCÉAU et al. (2000), ainda existem muitos dados conflitantes na literatura sobre os efeitos dos interferons tipo I no que diz respeito a sua atividade pró ou antiproliferativa e apoptótica, in vivo e in vitro, visto que seus mecanismos de ação ainda são pouco esclarecidos. De acordo com MARRACK et al. (1999) e TOUGH et al. (1996), os interferons tipo I possuem uma atividade anti-apoptótica em linfócitos T murinos. Todavia, em pacientes com esclerose múltipla o IFN- β mostrou-se pró-apoptótico tanto em in vivo quanto in vitro (VAN WEYENBERGH et al., 2001; KASER et al., 1999). Em doadores normais, TRETTER et al. (1998) observaram que o IFN- α juntamente com estímulo com *anti*-CD3 possui um efeito pró-apoptótico através da indução de morte celular induzida por ativação (AICD). ZIPP et al. (2000) demonstraram um efeito anti-apoptótico em células T antígeno específicas, nos quais IFN- β aumentou moderadamente a expressão de CD95 na superfície destas células, mas não foi capaz de modular a atividade das caspases ou fragmentação de DNA.

Entretanto, os Interferons tipo I são amplamente usados na clínica, embora seus mecanismos de ação ainda estejam pouco esclarecidos. O IFN- α vem sendo

utilizado extensivamente no tratamento de ATL, geralmente em combinação com um antiviral (HERMINE et al., 1995; MATUTES et al., 2001), bem como no tratamento de HAM/TSP (IJICHI et al., 1995; IZUMO et al., 1996) enquanto que o IFN- β está sendo cada vez mais utilizado no tratamento de esclerose múltipla (ARBIZU et al., 2000; LI et al., 2001; OSSEGE et al., 2001). Em analogia à esclerose múltipla, o IFN- β já está sendo introduzido no tratamento de HAM/TSP (JACOBSON S. & MELO A. – NIH e HUPES/UFBA – comunicação pessoal).

Finalmente, buscamos avaliar os efeitos do IFN- β e estimulação com *anti*-CD3 na transcrição do gene pX (proteína Tax) viral, sabendo que a proteína Tax estimula a proliferação celular de linfócitos através da indução de transcrição de vários genes.

Verificamos que o efeito antiproliferativo do IFN- β e do *anti*-CD3 ou dos dois juntos não resultou numa diminuição da transcrição viral, já que os níveis do mRNA para o Tax permaneceram inalterados na análise por PCR (Figura 14). Podemos concluir então, que em pacientes com HAM/TSP, o IFN- β exerce uma atividade antiproliferativa significativa *in vitro*, aparentemente na ausência de atividade antiviral (via Tax), o que talvez possa explicar a ausência de apoptose, *in vitro*, induzida pelo IFN- β , visto que, a expressão de Tax induz a translocação de NF- κ B para o núcleo mantendo sua ativação constitutiva em células T infectadas (BÉRAUD & GREENE, 1996; YOSHIDA, 2001) podendo tornar estas células resistentes a apoptose (KAWAKAMI et al., 1999; SUN & BALLARD, 1999). De acordo com TAYLOR et al. (1999), a diminuição da carga viral em HAM/TSP não resulta em melhora clínica, sugerindo que a diminuição da linfoproliferação seja mais importante.

Portanto, de acordo com nossos resultados, podemos sugerir medidas terapêuticas futuras com o uso combinado de IFN- β , antiproliferativo, e vitamina C (ou outros) a qual mostrou-se capaz de diminuir significativamente a expressão de Tax e induzir um aumento na apoptose in vitro (pôster apresentado no Congresso da SBI, 2001 - em anexo). Pretendemos então, tentar elucidar os mecanismos da regulação da morte celular programada via Tax e o papel dos IFN e da iNOS através da utilização de células T Jurkat transfectadas com as proteínas Tax e Rex do HTLV-I (HAMAIA et al., 1997).

6 CONCLUSÕES

- O aumento da expressão do mRNA da iNOS ex vivo, embora tenha sido muito variável, mostrou-se maior em indivíduos assintomáticos do que em pacientes com HAM/TSP, sugerindo um provável efeito anti-apoptótico da iNOS nos assintomáticos.
- A diminuição na expressão de mRNA para Fas, FasL e pró-caspase-3 quando comparamos pacientes com HAM/TSP e indivíduos assintomáticos e o aumento da pró-caspase-1 nos pacientes, evidenciam que uma diminuição da morte celular programada poderia ter influência no processo patológico.
- Em relação à presença de moléculas envolvidas no processo apoptótico, observamos um aumento significativo da expressão de Fas na superfície em pacientes com HAM/TSP e assintomáticos, quando comparados com doadores normais, porém, este aumento não se correlacionou com a marcação com anexina V, propondo que a morte celular apoptótica é inibida ou no mínimo retardada nos pacientes com HAM/TSP.
- Na proliferação celular e na apoptose espontânea ou induzida em células mononucleares (PBMC) de pacientes com HAM/TSP in vitro, o inibidor de iNOS, o IFN- α e o IFN- β mostraram uma significativa atividade anti-proliferativa (L-NMMA = IFN- α < IFN- β), mas não pró-apoptótica.

- As células de pacientes, entretanto, mostraram-se sensíveis ao estímulo com *anti*-CD3 na indução da apoptose e diminuição da linfoproliferação, porém, a ação antiproliferativa do IFN- β e do *anti*-CD3 não resultou numa diminuição da transcrição viral, já que os níveis dos RNAs para pX e LTR se mostraram inalteráveis, indicando que seus efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos estariam ocorrendo independente da transcrição viral.
- De acordo com nossos resultados, o uso combinado de IFN- β e outras drogas antivirais ou pró-apoptóticas poderia ser considerado em futuros ensaios terapêuticos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, **281**: 1322-6, 1998.

AGGARWAL, B.B. Apoptosis and nuclear factor-kappa B: a tale of association and dissociation. **Biochem. Pharmacol.**, **60**:1033-1039, 2000.

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, **357**:593-615, 2001.

AL-FAHIM, A.; CABRE, P.; KASTRUKOFF, L.; DOROVINI-ZIS K., OGER J. Blood mononuclear cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy: lymphocytes are highly activated and adhesion to endothelial cells is increased. **Cell. Immunol.**, **198**:1-10, 1999.

ARAÚJO, A.Q.; DE ANDRADE-SERPA, M.J. Tropical spastic paraparesis / HTLV-I-associated myelopathy in Brazil. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **13**: S33-S37, 1996. Suplemento 1.

ARAVIND, L.; DIXIT, V.M.; KOONIN, E. The domains of death: evolution of the apoptosis machinery. **Trends Biochem. Sci.**, **24**: 47-53, 1999.

ARBIZU, T.; ALVAREZ-CERMENO, J.C.; DECAP, G.; FERNANDEZ, O.; URIA, D.F.; GARCIA MERINO, A.; IZQUIERDO, G.; MONTALBAN, X. Interferon beta-1b treatment in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis under a standardized protocol in Spain. **Acta Neurol. Scand.**, **102**:209-217, 2000.

ARNOLD, R.; SEIFERT, M.; ASADULLAH, K.; VOLK, H.D. Crosstalk between keratinocytes and T lymphocytes via Fas/Fas ligand interaction: modulation by cytokines. **J. Immunol.**, **162**: 7140-7147, 1999.

AZIMI, N.; JACOBSON, S.; LEIST, T.; WALDMANN, T.A. Involvement of IL-15 in the pathogenesis of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: implications for therapy with a monoclonal antibody directed to the IL-2/15R beta receptor. **J. Immunol.**, **163**: 4064 -4072, 1999.

BADLEY, A.D.; PILON, A.A.; LANDAY, A.; LYNCH, D.H. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis. **Blood**, **96**:2951-2964, 2000.

BALDWIN, A.S. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. **J. Clin. Invest.**, **107**:241-246, 2001.

BAMFORD, R.N.; GRANT, A.J.; BURTON, J.D.; PETERS, C.; KURYS, G.; GOLDMAN, C.K.; BRENNAN, J.; ROESSLER, E.; WALDMANN, T.A. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **91**:4940-4941994.

BANGHAM, C.R. The immune response to HTLV-I. **Curr. Opin. Immunol.**, **12**:397-402, 2000.

BERAUD, C.; GREENE, W.C. Interaction of HTLV-I Tax with the human proteasome: implications for NF-kappa B induction. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **13**:S76-S84, 1996. Supplemento 1.

BIDDISON, W.E.; KUBOTA, R.; KAWANISHI, T.; TAUB, D.D.; CRUIKSHANK, W.W.; CENTER, D.M.; CONNOR, E.W.; TUZ, U., JACOBSON, S. Human T cell Leukemia Virus Type I (HTLV-1)-Specific CD8+ CTL clones from patients with HTLV-1-Associated Neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. **J. Immunol.**, **159**:2018-2025, 1997.

BITTENCOURT, A.L. Vertical transmission of HTLV-I/II: a review. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, **40**:245-251, 1998.

BITTENCOURT, A.L.; DOURADO, I.; BASTOS-FILHO P.; SANTOS, M.; VALADAO, E.; ALCANTARA, L.C.; GALVAO-CASTRO, B. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in northeastern Brazil. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Human Retrovirol.**, **26**:490-494, 2001.

BRAUWEILER, A.; GARRUS, J.E.; REED, J.C.; NYBORG, J.K. Repression of bax gene expression by the HTLV-1 Tax protein: implications for suppression of apoptosis in virally infected cells. **Virology**, **231**:135-140, 1997.

BUCKLE, G.J.; HAFLER, D.A.; HOLLSBERG, P. HTLV-I-induced T-cell activation. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **13**:S107-S113, 1996. Suplemento 1.

CANN, A.J.; ROSENBLATT, J.D.; WACHSMAN, W.; SHAH, N.P.; CHEN, I.S. Identification of the gene responsible for human T-cell leukaemia virus transcriptional regulation. **Nature**, **318**:571-574, 1985.

CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O.; PORTO, A.F.; BRAGA, S.; GALVAO-CASTRO, B.; NEVA, F. Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. **J Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **27**:1-6, 2001.

CASTRO-COSTA, C.M.; SALGUEIRO, M.R.; CARTON, H.; VALE, O.C.; ARRUDA, A.M. Tropical spastic paraparasis in northeastern Brazil. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, **47**:134-138, 1989.

CERESETO, A.; MULLOY, J.C.; FRANCHINI, G. Insights on the pathogenicity of human T-lymphotropic/leukemia virus types I and II. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **13**:S69-S75, 1996. Supplemento 1.

CHEN, X.; ZACHAR, V.; ZDRAVKOVIC, M.; GUO, M.; EBBESEN, P.; LIU, X. Role of the Fas/Fas ligand pathway in apoptotic cell death induced by the human T cell lymphotropic virus type I Tax transactivator. **J. Gen. Virol.**, **78**: 3277-3285, 1997.

CUMMINGS, M.C.; WINTERFORD, C.M.; WALKER, N.I. Apoptosis/ Historical Section. **Am. J. Surg. Pathol.**, **21**: 88-101, 1997.

DE THÉ, G. The history of HTLV-I. **Leuk. Res.**, **17**:383-384, 1993.

DOURADO, I.; ANDRADE, T.; CARPENTER, C.L.; GALVAO-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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**:13-18, 1999.

DOURADO, I.; BARRETO, M.L.; TEIXEIRA, M.G.; GALVÃO-CASTRO, B. Seroprevalence of Human T cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) in the general population of Salvador, Northeast Brazil. **In press**.

FANTUZZI, G.; DINARELLO, C.A. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). **J. Clin. Immunol.** **19**:1-11, 1999.

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

FURUKAWA, Y.; BANGHAM, C.R.; TAYLOR, G.P.; WEBER, J.N.; OSAME, M. Frequent reversible membrane damage in peripheral blood B cells in human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Clin. Exp. Immunol.**, **120**:307-316, 2000A.

FURUKAWA, Y.; KUBOTA, R.; TARA, M.; IZUMO, S.; OSAME, M. Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. **Blood**, **97**:987-993, 2001.

FURUKAWA, Y.; YAMASHITA, M.; USUKU, K.; IZUMO, S.; NAKAGAWA, M.; OSAME, M. Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J. Infect. Dis.**, **182**:1343-1349, 2000B.

GALLO, R.C. The human T-cell leukemia/lymphotropic retroviruses (HTLV) family: past, present, and future. **Cancer Res.**, **45**:4524S-4533, 1995. Supplemento 9.

GALVÃO-CASTRO, B.; LOURES, L.; RODRIQUES, L.G.; SERENO, A.; FERREIRA JUNIOR, O.C.; FRANCO, L.G.; MULLER, M.; SAMPAIO, D.A.; SANTANA, A.; PASSOS, L.M.; PROIETTI, F. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, **37**:242-243, 1997.

GESSAIN, A.; BARIN, F.; VERNANT, J.C.; GOUT, O.; MAURS, L.; CALENDER, A.; DE THE, G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, **2**:407-410, 1985.

GIRI, J.G.; AHDIEH, M.; EISENMAN, J.; SHANEBECK, K.; GRABSTEIN, K.; KUMAKI, S.; NAMEN, A.; PARK, L.S.; COSMAN, D.; ANDERSON, D. Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. **EMBO J.**, **13**:2822-2830, 1994.

GOUBAU, P.; VANDAMME, A.M.; DESMYTER, J. Questions on the evolution of primate T-lymphotropic viruses raised by molecular and epidemiological studies of divergent strains. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.** **13**:S242-S247, 1996. Supplemento 1.

GOUT, O.; GESSAIN, A.; IBA-ZIZEN, M.; KOUZAN, S.; BOLGERT, F.; DE THE, G.; LYON-CAEN, O. The effect of zidovudine on chronic myelopathy associated with HTLV-1. **J Neurol.**, **238**:108-109, 1991.

GRANVILLE, D.J.; CARTHY, C.M.; HUNT, D.W.C.; McMANUS, B. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. **Lab. Invest.**, **78**:893-909, 1998.

HALL, W.W.; LIU, C.R.; SCHNEEWIND, O.; TAKAHASHI, H.; KAPLAN, M.H.; ROUPE, G.; VAHLNE, A. Deleted HTLV-I provirus in blood and cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. **Science**, **253**:317-320, 1991.

HAMAIA, S.; CASSE, H.; GAZZOLO, L.; DUC DODON, M. The human T-cell leukemia virus type 1 Rex regulatory protein exhibits an impaired functionality in human lymphoblastoid Jurkat T cells. **J. Virol.**, **71**:8514-8521, 1997.

HAMASAKI, S.; NAKAMURA, T.; FURUYA, T.; KAWAKAMI, A.; ICHINOSE, K.; NAKASHIMA, T.; NISHIURA, Y.; SHIRABE, S.; EGUCHI, K. Resistance of CD4-positive T lymphocytes to etoposide-induced apoptosis mediated by upregulation of Bcl-xL expression in patients with HTLV-I-associated myelopathy. **J. Neuroimmunol.**, **117**:143-148, 2001.

HANON, E.; STINCHCOMBE, J.C.; SAITO, M.; ASQUITH, B.E.; TAYLOR, G.P.; TANAKA, Y.; WEBER, J.N.; GRIFFITHS, G.M.; BANGHAM, C.R. Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. **Immunity**, **13**:657-664, 2000.

HASHIMOTO, K.; HIGUCHI, I.; OSAME M.; IZUMO, S. Quantitative in situ PCR assay of HTLV-1 infected cells in peripheral blood lymphocytes of patients with ATL, HAM/TSP and asymptomatic carriers. **J. Neurol. Sci.**, **159**:67-72, 1998.

HERMINE, O.; BOUSCARY, D.; GESSAIN, A.; TURLURE, P.; LEBLOND, V.; FRANCK, N.; BUZYN-VEIL, A.; RIO, B.; MACINTYRE, E.; DREYFUS, F.; BAZARBACHI, A. Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with zidovudine and interferon alfa. **N.Engl. J. Med.**, **332**:1749-1751, 1995.

HETTMANN, T., DIDONATO, J.; KARIN, M.; LEIDEN, J.M. An essential role for nuclear factor κ B in promoting double positive Thymocyte apoptosis. **J. Exp. Med.**, **189**:145-157, 1999.

HOCKENBERY, D. Defining Apoptosis / Review. **Am. J. Pathol.**, **146**:16-20, 1995.

HOLLSBERG, P. Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, **63**:308-333, 1999.

HOLLSBERG, P. Pathogenesis of chronic progressive myelopathy associated with human T-cell lymphotropic virus type I. **Acta Neurol., Scand.**, **169**:86-93, 1997. Supplemento.

HUA, L.L.; LIU, J.S.; BROSNAN, C.F.; LEE, S.C. Selective inhibition of human glial inducible nitric oxide synthase by interferon-beta: implications for multiple sclerosis. **Ann. Neurol.**, **43**:384-387, 1998.

IFN MULTIPLE SCLEROSIS STUDY GROUP. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Neurology**, **43**:655-661, 1993.

IJICHI, S.; IZUMO, S.; NAGAI, M.; SHINMYOZU, K.; HALL, W.W.; OSAME, M. Anti-viral and immunomodulatory effects of interferon-alpha on cultured lymphocytes from patients with human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). **J. Neuroimmunol.**, **61**:213-221, 1995.

INOUE, A.; KOH, C.S.; SAKAI, T.; YAMAZAKI, M.; YANAGISAWA, N.; USUKU, K.; OSAME, M. Detection of the soluble form of the Fas molecule in patients with multiple sclerosis and human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy. **J. Neuroimmunol.**, **75**:141-146, 1997.

ISAACS, A.; LINDENMANN, J. Virus interference. I- interferon. **Proc. R. Soc. Lond., B.** **147**:256-67, 1957.

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.

JACOBSON, S. Cellular immune responses to HTLV-I: immunopathogenic role in HTLV-I-associated neurologic disease. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **13**:S100-S106, 1996. Supplemento 1.

JEFFERY, K.J.; USUKU, K.; HALL, S.E.; MATSUMOTO, W.; TAYLOR, G.P.; PROCTER, J.; BUNCE, M.; OGG, G.S.; WELSH, K.I.; WEBER, J.N.; LLOYD, A.L.; NOWAK, M.A.; NAGAI, M.; KODAMA, D.; IZUMO, S.; OSAME, M.; BANGHAM, C.R. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **96**:3848-3853, 1999.

KAJIYAMA, W.; KASHIWAGI, S.; IKEMATSU, H.; HAYASHI, J.; NOMURA, H.; OKOCHI, K. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. **J. Infect. Dis.**, **154**:851-857, 1986.

KALYANARAMAN, V.S.; SARNGADHARAN, M.G.; ROBERT-GUROFF, M.; MIYOSHI, I.; GOLDE, D.; GALLO, R.C. 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.

KAPLAN, J.E.; KHABBAZ, R.F.; MURPHY, E.L.; HERMANSEN, S.; ROBERTS, C.; LAL, R.; HENEINE, W.; WRIGHT, D.; MATIJAS, L.; THOMSON, R.; RUDOLPH, D.; SWITZER, W.M.; KLEINMAN, S.; BUSCH, M.; SCHREIBER, G.B. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. The Retrovirus Epidemiology Donor Study Group. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **12**:193-201, 1996.

KASER, A.; DEISENHAMMER, F.; BERGER, T.; TILG, H. Interferon-beta 1b augments activation-induced T-cell death in multiple sclerosis patients. **Lancet**, **353**:1413-1414, 1999.

KAWAHIGASHI, N.; FURUKAWA, Y.; SAITO, M.; USUKU, K.; OSAME, M. Predominant expression of Fas ligand mRNA in CD8⁺ T lymphocytes in patients with HTLV-1 associated myelopathy. **J. Neuroimmunol.**, **90**:199-206, 1998.

KAWAKAMI, A.; NAKASHIMA, T.; SAKAI, H.; URAYAMA, S.; YAMASAKI, S.; HIDA, A.; TSUBOI, M.; NAKAMURA, H.; IDA, H.; MIGITA, K.; KAWABE, Y.; EGUCHI, K. Inhibition of caspase cascade by HTLV-I tax through induction of NF-kappaB nuclear translocation. **Blood**, **94**:3847-3854, 1999.

KINOSHITA, K.; HINO, S.; AMAGASKI, T.; IKEDA, S.; YAMADA, Y.; SUZUYAMA, J.; MOMITA, S.; TORIYA, K.; KAMIHIRA, S.; ICHIMARU, M. Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three seropositive mothers. **Gann**, **75**:103-105, 1984.

KISHI, S.; SAIJYO, S.; ARAI, M.; KARASAWA, S.; UEDA, S.; KANNAGI, M.; IWAKURA, Y.; UJII, M.; YONEHARA, S. Resistance to fas-mediated apoptosis of peripheral T cells in human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) transgenic mice with autoimmune arthropathy. **J. Exp. Med.**, **186**:57-64, 1997.

KOLB, J.P. Mechanisms involved in the pro- and anti-apoptotic role of NO in human leukemia. **Leukemia**, **14**:1685-1694, 2000.

KOLENKO, V.; BLOOM, T.; RAYMAN, P.; BUKOWSKI, R.; HSI, E.; FINKE, J. Inhibition of NF-kB activity in human T lymphocytes induces caspase-dependent apoptosis without detectable activation of caspase 1 and 3. **J. Immunol.**, **163**:590-598, 1999.

KONDO, Y.; KOMO, H.; NONAKA, H.; MIYAMOTO, N.; TOSHIDA, R.; BANDO, F.; INOVE, H.; MIYOSHI, I.; HINUMA, Y.; HANAOKA, M. Risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in HTLV-I carriers. **Lancet**, **2**:159, 1987.

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. **J. Immunol.**, **161**:482-488, 1998.

KUBOTA, R.; KAWANISHI, T.; MATSUBARA, H.; MANNS, A.; JACOBSON, S. HTLV-I specific IFN-gamma⁺ CD8⁺ lymphocytes correlate with the proviral load in peripheral blood of infected individuals. **J. Neuroimmunol.**, **102**:208-215, 2000.

KURODA, Y.; KUROHARA, K.; FUJIYAMA, F.; TAKASHIMA, H.; ENDO, C.; MATSUI, M.; NESHIGE, R.; KAKIGI, R. Systemic interferon-alpha in the treatment of HTLV-I-associated myelopathy. **Acta Neurol. Scand.**, **86**:82-86, 1992.

KURODA, Y.; TAKASHIMA, H.; IKEDA, A.; ENDO, C.; NESHIGE, R.; KAKIGI, R.; SHIBASAKI, H. Treatment of HTLV-I-associated myelopathy with high-dose intravenous of gammaglobulin. **J. Neurol.**, **238**:309-314, 1991.

LI, D.K.; ZHAO, G.J.; PATY, D.W. Randomized controlled trial of interferon-beta-1a in secondary progressive MS: MRI results. **Neurology**, **56**:1505-1513, 2001.

LIU, H.F.; VANDAMME, A.M.; VAN BRUSSEL, M.; DESMYTER, J.; GOUBAU, P. New retroviruses in human and simian T-lymphotropic viruses. **Lancet**, **344**:265-266, 1994.

MACCHI, B.; GRELLI, S.; FAVALLI, C.; DE CARLI, M.; GARACI, E.; MASTINO, A. Characteristics of Interleukin 2 and Interleukin 4 dependent T cell lines infected with HTLV-1 *in vitro*. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, **10**:189-194, 1997.

MACCHI, B.; GRELLI, S.; MATTEUCCI, C.; D'ELIOS, M.M.; DE CARLI, M.; FAVALLI, C. DEL PRETE, G., MASTINO, A. Human Th1 and Th2 T-cell clones are equally susceptible to infection and immortalization by human T-lymphotropic virus type I. **J. Gen. Virol.**, **79**:2469-2474, 1998.

MAEDA, Y.; FURUKAWA, M.; TAKEHARA, Y.; YOSHIMURA, K.; MIYAMOTO, K.; MATSUURA, T.; MORISHIMA, Y.; TAJIMA, K.; OKOCHI, K.; HINUMA, Y. Prevalence of possible adult T-cell leukemia virus-carriers among volunteer blood donors in Japan: a nation-wide study. **Int. J. Cancer**, **33**:717-720, 1984.

MALONEY, E.M.; RAMIREZ, H.; LEVIN, A.; BLATTNER, W.A. A survey of the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in south-western Colombia. **Int. J. Cancer**, **44**:419-423, 1989.

MANNS, A.; BLATTNER, W.A. The epidemiology of the human T-cell lymphotropic virus type I and type II: etiologic role in human disease. **Transfusion**, **31**:67-75, 1991.

MANNS, A.; SADA, M.; LA GRENADE, L. Human T-lymphotropic virus type I infection. **Lancet**, **353**:1951-1958, 1999.

MANNS, A.; WILKS, R.J.; MURPHY, E.L.; HAYNES, G.; FIGUEROA, J.P.; BARNETT, M.; HANCHARD, B.; BLATTNER, W.A. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. **Int. J. Cancer**, **51**:886-891, 1992.

MARKS-KONCZALIK, J.; DUBOIS, S.; LOSI, J.M.; SABZEVARI, H.; YAMADA, N.; FEIGENBAUM, L.; WALDMANN, T.A.; TAGAYA, Y. IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **97**:11445-11450, 2000

MARRACK, P.; KAPPLER, J.; MITCHELL, T. Type I interferons keep activated T cells alive. **J. Exp. Med.**, **189**:521-530, 1999.

MARTINS-CASTRO, L.H.; CHAVES, C.J.; CALLEAGRO, D.; NOBREGA, J.P.S.; SCAFF, M. HTLV-I associated myelopathy in Brazil; a preliminary report. **Arq. Neuro-Psiquiatr.**, **47**:501-502, 1989.

MATUTES, E.; TAYLOR, G.P.; CAVENAGH, J.; PAGLIUCA, A.; BAREFORD, D.; DOMINGO, A.; HAMBLIN, M.; KELSEY, S.; MIR, N.; REILLY, J.T. Interferon alpha and zidovudine therapy in adult T-cell leukaemia lymphoma: response and outcome in 15 patients. **Br. J. Haematol.**, **113**:779-784, 2001.

MIGONE, T.S.; LIN, J.X.; CERESETO, A.; MULLOY, J.C.; O'SHEA, J.J.; FRANCHINI, G.; LEONARD, W.J. Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. **Science**, **269**:79-81, 1995.

MOCHIZUKI, M.; WATANABE, T.; YAMAGUCHI, K.; TAJIMA, K.; YOSHIMURA, K.; NAKASHIMA, S.; SHIRAO, M.; ARAKI, S.; MIYATA, N.; MORI, S.; et al. Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical, and virologic studies. **J. Infect. Dis.**, **166**:943-944, 1992.

MORGAN, O.S.; RODGERS-JOHNSON, P.; MORA, C.; CHAR, G. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. **Lancet**, **2**:1184-1187, 1989.

MORI, N.; NUNOKAWA, Y.; YAMADA, Y.; IKEDA, S.; TOMONAGA, M.; YAMAMOTO, N. Expression of human inducible nitric oxide synthase gene in T-cell lines infected with human T-cell leukemia virus type-I and primary adult T-cell leukemia cells. **Blood**, **94**:2862-2870, 1999.

MURPHY, E.L.; BLATTNER, W.A. HTLV-I-associated leukemia: a model for chronic retroviral diseases. **Ann. Neurol.**, **23**:S174-S180, 1988. Supplemento.

MURPHY, E.L.; FIGUEROA, J.P.; GIBBS, W.N.; HOLDING-COBHAM, M.; CRANSTON, B.; MALLEY, K.; BODNER, A.J.; ALEXANDER, S.S.; BLATTNER, W.A. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. **Am. J. Epidemiol.**, **133**:1114-1124, 1991.

NAGAI, M.; KUBOTA, R.; GRETEN, T.F.; SCHNECK, J.P.; LEIST, T.P.; JACOBSON, S. Increased activated human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax11-19-specific memory and effector CD8⁺ cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV-I provirus load. **J. Infect. Dis.**, **183**:197-205, 2001.

NAGAI, M.; USUKU, K.; MATSUMOTO, W.; KODAMA, D.; TAKENOUCI, N.; MORITOYO, T.; HASHIGUCHI, S.; ICHINOSE, M.; BANGHAM, C.R.; 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. **J. Neurovirol.**, **4**:586-593, 1998.

NAKAGA, W.A.M.; NAKAHARA, K.; MARUYAMA, Y.; KAWABATA, M.; HIGUCHI, I.; KUBOTA, H.; IZUMO, S.; ARIMURA, K.; OSAME, M. Therapeutic trials in 200 patients with HTLV-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis. **J. Neurovirol.**, **2**:345-355, 1996.

NICOT, C.; HARROD, R. Distinct p300-responsive mechanisms promote caspase-dependent apoptosis by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax protein. **Mol. Cell. Biol.**, **20**:8580-8589, 2000.

NIEWIESK, S.; DAENKE, S.; PARKER, C.E.; TAYLOR, G.; WEBER, J.; NIGHTINGALE, S.; BANGHAM, C.R. Naturally occurring variants of human T-cell leukemia virus type I Tax protein impair its recognition by cytotoxic T lymphocytes and the transactivation function of Tax. **J. Virol.**, **69**:2649-2653, 1995.

NISHIOKA, K.; MARUYAMA, I.; SATO, K.; KITAJIMA, I.; NAKAJIMA, Y.; OSAME, M. Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. **Lancet**, **1**:441, 1989.

NUNOKAWA, Y.; OIKAWA, S.; TANAKA, S. Human inducible nitric oxide synthase gene is transcriptionally regulated by nuclear factor-kappaB dependent mechanism. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **223**:347-352, 1996.

OSAME, M.; IGATA, A.; MATSUMOTO, M.; KOHKA, M.; USUKU, K.; IZUMO, S. HTLV-I associated myelopathy (HAM); treatment trials, retrospective survey and clinical and laboratory findings. **Hematol. Rev.**, **3**:271-284, 1990.

OSAME, M.; USUKU, K.; IZUMO, S.; IJICHI, N.; AMITANI, H.; IGATA, A.; MATSUMOTO, M.; TARA, M. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**, **1**:1031-1032, 1986.

OSSEGE, L.M.; SINDERN, E.; PATZOLD, T.; MALIN, J.P. Immunomodulatory effects of interferon-beta-1b in patients with multiple sclerosis. **Int. Immunopharmacol.**, **1**:1085-1100, 2001.

PILLING, D.; AKBAR A. N.; GIRDLESTONE J.; ORTEU C.H.; BORTHWICK N.J.; AMFT N.; SCHEEL-TOELLNER D.; BUCKLEY C.D.; SALMON, M. Interferon- β mediates stromal cell rescue of T cells from apoptosis. **Eur. J. Immunol.**, **29**:1041-1050, 1999.

POIESZ, B.J.; RUSCETTI, F.W.; GAZDAR, A.F.; BUNN, P.A.; MINNA, J.D.; GALLO, R.C. 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, 1980.

POMBO DE OLIVEIRA, M.S.; LOUREIRO, P.; BITTENCOURT, A.; CHIATTONE, C.; BORDUCCHI, D.; DE CARVALHO, S.M.; BARBOSA, H.S.; RIOS, M.; SILL, A.; CLEGHORN, F.; BLATTNER, W. Geographic diversity of adult t-cell leukemia/lymphoma in Brazil. The Brazilian ATLL Study Group. **Int. J. Cancer**, **83**:291-298, 1999.

POMBO DE OLIVEIRA, M.S.; MATUTES, E.; FAMADAS, L.C.; SCHULZ, T.; CLABRO, M.L.; NUCCI, M.; ANDRADA-SERPA, M.J.; TEDDER, R.S.; WEISS, R.A.; CATOVSKY, D. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Brazil and its relation to HTLV-I. **Lancet**, **336**:987-990, 1990.

POPOVIC, M.; REITZ-Jr., M.S.; SARNGADHARAN, M.G.; ROBERT-GUROFF, M.; KALYANARAMAN, V.S.; NAKAO, Y.; MIYOSHI, I.; MINOWADA, J.; YOSHIDA, M.; ITO, Y.; GALLO, R.C. The virus of Japanese adult T-cell leukaemia is a member of the human T-cell leukaemia virus group. **Nature**, **300**: 63-66, 1982.

PROIETTI ABFC. HTLV-I e II. **Cad. Hemominas**, 2000.

RATHMELL, J. C.; THOMPSON, C. B. The central effectors of cell death in the immune system. **Ann. Rev. Immunol.**, **17**: 781-828, 1999.

RICHARDSON, J.H.; EDWARDS, A.J.; CRUICKSHANK, J.K.; RUDGE, P.; DALGLEISH, A.G. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type I. **J. Virol.**, **64**:5682-5687, 1990.

RICHARDSON, J.H.; HOLLSBERG, P.; WINDHAGEN, A.; CHILD, L.A.; HAFLER, D.A.; LEVER, A.M. Variable immortalizing potential and frequent virus latency in blood-derived T-cell clones infected with human T-cell leukemia virus type I. **Blood**, **89**:3303-3314, 1997.

SAGGIORO, D.; BARP, S.; CHIECO-BIANCHI, L. Block of a mitochondrial-mediated apoptotic pathway in Tax-expressing murine fibroblasts. **Exp. Cell. Res.**, **269**:245-255, 2001.

SAITO, M.; NAKAMURA, N.; NAGAI, M.; SHIRAKAWA, K.; SATO, H.; KAWAHIGASHI, N.; FURUKAWA, Y.; USUKU, K.; NAKAGAWA, M.; IZUMO, S.; OSAME, M. Increased levels of soluble Fas ligand in CSF of rapidly progressive HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. **J. Neuroimmunol.**, **98**:221-226, 1999.

SAKAI, T.; INOUE, A.; KOH, C.S.; OSAME, M. Serum levels of apoptosis-related molecules in patients with multiple sclerosis and human T-lymphotropic virus Type I-associated myelopathy. **J. Interf. Cytok. Res.**, **19**:999-1004, 1999.

SANCÉAU, J.; HISCOTT, J.; DELATTRE, O.; WIETZERBIN, J. IFN-beta induces serine phosphorylation of Stat-1 in Ewing's sarcoma cells and mediates apoptosis via induction of IRF-1 and activation of caspase-7. **Oncogene**, **19**:3372-3383, 2000.

SANCÉAU, J.; WIETZERBIN, J. Interférons. **INSERM U365, Institut Curie**: 430-440, 1997.

SARIM, S.G.; FANG, C.; WILLIAMS, A. A Retroviral infections transmitted by blood transfusion. **Yale J. Biol. Med.**, **63**:353-360, 1990.

SCHOLZ, C.; FREEMAN, G.J.; GREENFIELD, E.A.; HAFLER, D.A.; HOLLSBERG, P. Activation of human T cell lymphotropic virus type I-infected T cells is independent of B7 costimulation. **J. Immunol.**, **157**:2932-2938, 1996.

SHEREMATA, W.A.; BENEDICT, D.; SQUILACOTE, D.C.; SAZANT, A. DE FREITAS, E. High-dose zidovudine induction in HTLV-I-associated myelopathy: safety and possible efficacy. **Neurology**, **43**:2125-2129, 1993.

SHIBAYAMA, K.; NAKAMURA, T.; NAGASATO, K.; SHIRABE, S.; TSUJIHATA, M.; NAGATAKI, S. Interferon-alpha treatment in HTLV-I-associated myelopathy. Studies of clinical and immunological aspects. **J. Neurol. Sci.**, **106**:186-192, 1991.

SIEGAL, F.P.; KADOWAKI, N.; SHODELL, M.; FITZGERALD-BOCARSLY, P.A.; SHAH, K.; HO, S.; ANTONENKO, S.; LIU, Y.J. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. **Science**, **284**:1835-1837, 1999.

SMITH, D.; BUCKLE, G.J.; HAFLER, D.A.; FRANK, D.A.; HOLLSBERG, P. HTLV-I-infected T cells evade the antiproliferative action of IFN-beta. **Virology**, **257**: 314-321, 1999.

SODROSKI, J.G.; ROSEN, C.A.; HASELTINE, W.A. Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells. **Science**, **225**:381-385, 1984.

SONODA, S.; FUJIYOSHI, T.; YASHIKI, S. Immunogenetics of HTLV-I/II and associated diseases. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **13**:S119-S123, 1996. Supplemento 1.

SONOKI, T.; MATSUZAKI, H.; NAGASAKI, A.; HATA, H.; YOSHIDA, M.; MATSUOKA, M.; KURIBAYASHI, N.; KIMURA, T.; HARADA, N.; TAKATSUKI, K.; MITSUYA, H.; MORI, M. Detection of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA by RT-PCR in ATL patients and HTLV-I infected cell lines: clinical features and apoptosis by NOS inhibitor. **Leukemia**, **13**: 713-718, 1999.

SUN, S.C.; BALLARD, D.W. Persistent activation of NF-kappaB by the tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular IkappaB kinases. **Oncogene**, **18**:6948-6958, 1999.

SUZUKI, T.; HIRAI, H.; FUJISAWA, J.; FUJITA, T.; YOSHIDA, M. A trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 binds to NF-kappa B p50 and serum response factor (SRF) and associates with enhancer DNAs of the NF-kappa B site and CArG box. **Oncogene**, **8**:2391-2397, 1993.

TAKATSUKI, K.; UCHIYAMA, T.; SAGAWA, K.; YODOI, J. Adult T-cell leukaemia in Japan. In: SENO S, TAKAKU F, IRINO S, (Eds.). **Topics in Haematology**. Amsterdam: Excerpta Medica: 73-77, 1977.

TAYLOR, G.P.; HALL, S.E.; NAVARRETE, S.; MICHIE, C.A.; DAVIS, R.; WITKOVER, A.D.; ROSSOR, M.; NOWAK, M.A.; RUDGE, P.; MATUTES, E., BANGHAM, C.R.; WEBER, J.N. Effect of lamivudine on human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) DNA copy number, T-cell phenotype, and anti-tax cytotoxic T-cell frequency in patients with HTLV-1-associated myelopathy. **J. Virol.**, **73**:10289-10295, 1999.

THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, **267**: 1456-62, 1995.

TOUGH, D.F.; BORROW, P.; SPRENT, J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. **Science**, **272**:1947-190, 1996.

TRETTNER, T.; AMAN, M.J.; BUG, G.; HUBER, C.; PESCHEL, C. Hematopoietic growth factors are differentially regulated in monocytes and CD4+ T lymphocytes: influence of IFN-alpha and interleukin-4. **J. Interf. Cytok. Res.**, **18**:95-102, 1998.

TSUKAHARA, T.; KANNAGI, M.; OHASHI, T.; KATO, H.; ARAI, M.; NUNEZ, G.; IWANAGA, Y.; YAMAMOTO, N.; OHTANI, K.; NAKAMURA, M.; FUJII, M. Induction of Bcl-x(L) expression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through NF-kappaB in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. **J. Virol.**, **73**:7981-7987, 1999.

UCHIYAMA, T.; YODOI, J.; SAGAWA, K.; TAKATSUKI, K.; UCHINO, H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematological features of 16 cases. **Blood**, **50**:481-492, 1977.

VAN WEYENBERGH, J.; LIPINSKI P.; ABADIE A.; CHABAS D.; BLANK U.; LIBLAU R.; WIETZERBIN J. Antagonistic action of IFN- β and IFN- γ on high affinity Fc γ receptor expression in healthy controls and Multiple Sclerosis Patients. **J. Immunol.**, **161**:1568-1574, 1998.

VAN WEYENBERGH, J.; WIETZERBIN, J.; ROUILLARD, D.; BARRAL-NETTO, M.; LIBLAU, R. Treatment of multiple sclerosis patients with interferon-beta primes monocyte-derived macrophages for apoptotic cell death. **J. Leukoc. Biol.**, **70**:745-748, 2001.

VIDAL, A.U.; GESSAIN, A.; YOSHIDA, M.; TEKAIA, F.; GARIN, B.; GUILLEMAIN, B.; SCHULZ, T.; FARID, R.; DE THE, G. Phylogenetic classification of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. **J. Gen. Virol.**, **75**:3655-3666, 1994.

WALDMANN, T.A.; DUBOIS, S.; TAGAYA, Y. Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. **Immunity**, **14**:105-110, 2001.

WATANABE, T.; SEIKI, M.; YOSHIDA, M. HTLV type I (U.S.isolate) and ATL (Japanese isolate) are the same species of human retrovirus. **Virology**, **133**:238-241, 1984.

WODARZ, D.; NOWAK, M.A.; BANGHAM, C.R.M. The dynamics of HTLV-1 and the CTL response. **Immunol. Today**, **20**:220-227, 1999.

WUCHERPFENNIG, K.W.; HOLLSBERG, P.; RICHARDSON, J.H.; BENJAMIN, D.; HAFLER, D.A. T-cell activation by autologous human T-cell leukemia virus type I-infected T-cell clones. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **89**:2110-2114, 1992.

YOSHIDA, M.; MIYOSHI, I.; HINUMA, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **79**:2031-2035, 1982.

YOSHIDA, M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. **Annu. Rev. Immunol.**, **19**:475-496, 2001.

ZHANG, X.; SUN, S.; HWANG, I.; TOUGH, D.F.; SPRENT, J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. **Immunity**, **8**:591-599, 1998.

ZHAO, H.; DUGAS, N.; MATHIOT, C.; DELMER, A.; DUGAS, B.; SIGAUX, F.; KOLB, J.P. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functional inducible nitric oxide synthase displaying anti-apoptotic activity. **Blood**, **92**: 1031-1043,1998.

ZHAO, L.J.; GIAM, C.Z. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator, Tax, enhances CREB binding to HTLV-I 21-base-pair repeats by protein-protein interaction. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **89**:7070-7074, 1992.

ZIPP, F.; BEYER, M.; GELDERBLOM, H.; WERNET, D.; ZSCHENDERLEIN, R.; WELLER, M. No induction of apoptosis by IFN-beta in human antigen-specific T cells. **Neurology**, **54**:485-487, 2000.

8 ANEXOS

Tabela 1: Características dos Pacientes com HAM/TSP

Amostras	Sexo	Idade	Tempo de doença	Escala KURTZKE	OBS
01	M	51	4 anos	K4	-
02	M	40	4 anos	K4	-
03	F	40	4 anos	K3	-
04	F	63	11 anos	K6	-
05	F		-	-	-
06	M	36	3 anos	K5	-
07	F	40	2 anos	K6	-
08	F	60	-	-	-
09	M	44	4 anos	K4	Tuberculose
10	F		-	-	-
11	M	53	-	K3	-
12	F	45	-	-	-
13	M	59	3 anos	K4	-
14	F	60	-	K5	Transfusão
15	M	38	1 ano	-	Usuário de droga
16	F	59	10 anos	-	-
17	F	56	-	-	-
18	F	49	1 ano	K4	-
19	M	57	1 ano	K6	Exp. profissional
20	F	49	2 anos	-	-
21	M	60	10 anos	-	-
22	M	46	1 ano	-	-
23	M	50	-	-	-
24	F	50	4 anos	-	-
25	F	62	-	-	-

Tabela 2: Anticorpos utilizados e especificações

Anticorpo	Conjugado	Clone	Isotipo	Companhia
IgG1	FITC/PE	679.1Mc7		Immunotech
IgG2a	FITC/PE	R35-95		BD PharMingen
anti-CD3	FITC	UCHT1	IgG1	BD PharMingen
anti-CD3		HIT3a	IgG2a	BD PharMingen
anti-CD19	FITC	4G7	IgG1	BDIS-San Jose
anti-CD56	PE	N901	IgG1	Immunotech
anti-HLA-DR	PE	L243	IgG2a	BDIS-San Jose
anti-CD95	PE	DX2	IgG1	BD PharMingen
anti-CD95L		NOK-1	IgG1	BD PharMingen
anti-CD95L	FITC	H11	IgG2a	Alexis corporation

Tabela 3: Sequência dos *primers* utilizados

Primer	Sequência
INOS-F	5'CGGTGCTGTATTTCCCTTACGAGGCCGAAGAAGG 3'
INOS-R	5'GGTGCTGCTTGTTAGGAGGTCAAGTAAAGGGC 3'
β -2m-F	5' CATCCAGCGTACTCCAAAGA 3'
β -2m-R	5' GACAAGTCTGAATGCTCCAC 3'
Fas-F	5' TCCTACCTCTGGTTCTTACG 3'
Fas-R	5' AGATCTGGATCCTTCCTCTT 3'
FasL-F	5' CCAGATGCACACAGCATCAT 3'
FasL-R	5' ATTGACCAGAGAGAGCTCAG 3'
Caspase-1-F	5' GGGTACAGCGTAGATGTGAAAAAAAAATCTCACTGCITCG 3'
Caspase-1-R	5' GCCCATTGTGGGATGTCTCCAAGAA 3'
Caspase-3-F	5' AAGGTATCCATGGAGAACACTGAAAAC 3'
Caspase-3-R	5' AACCACCAACCAACCATTTCT 3'
Tax-F	5' AGGGTTTGGACAGAGTCTTC 3'
Tax-R	5' ACCTTGAGGGTCTTAGAGGTTC 3'

Tabela 4: Ciclos utilizados nas Reações em Cadeia da Polimerase

Descrição	Ciclos	No.
iNOS; Fas/FasL; B2m	30'' (94°C)	1
	45'' (94°C)	35
	45'' (60°C)	35
	50'' (72°C)	35
	10' (72°C)	1
Pró-caspases 1 e 3	5' (94°C)	1
	30'' (92°C)	35
	30'' (60°C)	35
	30'' (72°C)	35
	10' (72°C)	1
	12°C	Forever
Tax; LTR; B2m	5' (94°C)	1
	1' (94°C)	35
	1' (55°C)	35
	1'30'' (72°C)	35
	10' (72°C)	1

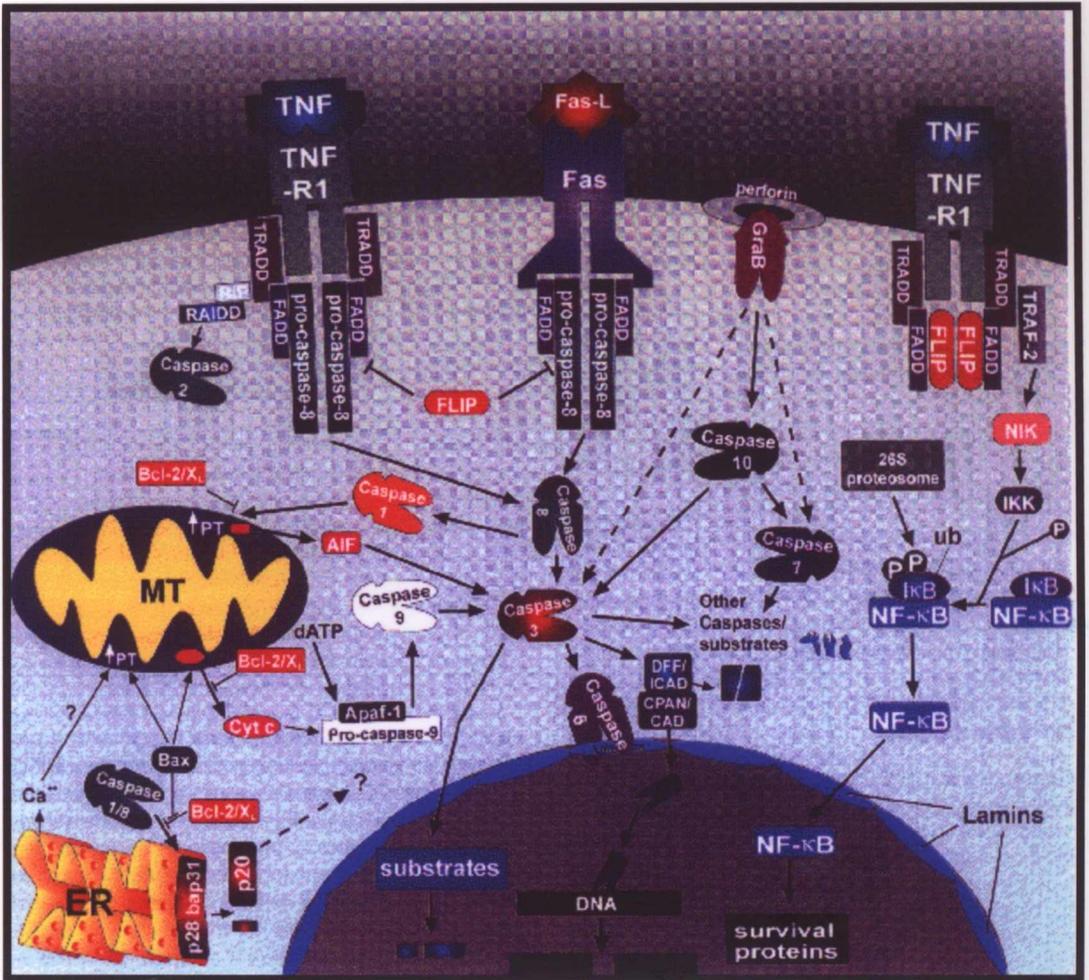


Figura 1. Aspectos Moleculares da Morte Celular / adaptado de GRANVILLE et al., 1998.



Differential effect of IFN- α , IFN- β and iNOS inhibitors on lymphocyte activation in asymptomatic and symptomatic HTLV-I seropositive individuals

Decanine D¹, Kolb JP⁵, Cardoso S¹, Andrade-Filho A³, Carvalho EM⁴, Galvão-Castro B² & Van Weyenbergh J¹
¹LIMI, ²LASP- Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, ³FNN, ⁴Serviço de Imunologia - HUPES/UFBA, Salvador, Brazil; ⁵ U365 INSERM - Institut Curie, Paris, France.

INTRODUCTION

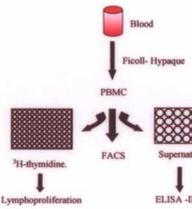
HTLV-1 was the First human retrovirus associated with a malignancy (ATL), amid other pathologies (HAM/TSP, uveitis, infective dermatitis of children and inflammatory and immune-mediated diseases). The seroprevalence in Brazilian blood donors is 0,41% and Salvador has the highest prevalence (1,35%) (Galvão-Castro, 1997). Infection with HTLV-1 cause strong lymphocyte activation and increased cytokine secretion. IFN- α and IFN- β have shown significant clinical benefit in HTLV-1 associated pathologies (Izmo, 1996 & Gill, 1995) and multiple sclerosis (The IFN MS study group, 1993) respectively. Recently, the presence of iNOS has been demonstrated in T-cell clones derived from patients with ATL and is suspected to have an anti-apoptotic effect (Sonoki, 1999).

OBJECTIVE

•Compare the effect of IFN- α , IFN- β and iNOS inhibitors *in vitro* on lymphocyte proliferation and cytokine secretion in HAM patients and asymptomatic HTLV-I seropositive individuals.

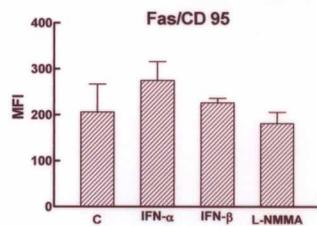
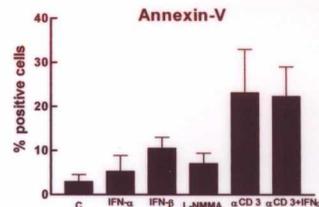
METHODS

- PBMC were isolated by FICOLL-HYPAQUE centrifugation.
- PBMC were cultured in 96-well round-bottom plates for proliferation assay and 24-well plates for quantification of cytokines (ELISA) and FACS analysis.
- Apoptosis related molecules were evaluated by FACS analysis (Facsort Becton & Dickinson) using fluorescent labeled antibodies.



RESULTS: 3

•Expression of apoptosis-related molecules in PBMC of HAM patients



DISCUSSION

•IFN- α and IFN- β display differential biological activities, at least *in vitro*, in distinct patient groups.

•IFN- α and IFN- β showed an inhibitory effect in spontaneous lymphoproliferation, but did not interfere with increased IFN- γ secretion in patients or asymptomatics.

•IFN- α , IFN- β and L-NMMA induced only modest increase in Fas/CD95 expression and apoptosis, in contrast to anti-CD3 stimulation.

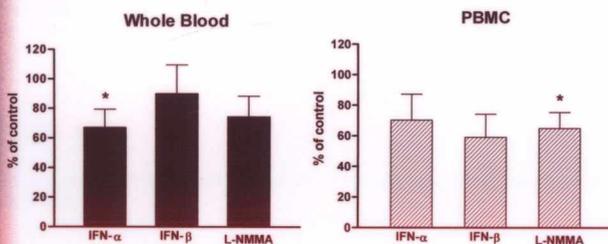
•Our results suggest that IFN- β might possibly be considered as a complementary or alternative therapy in HAM patients

REFERENCES

- GALVÃO-CASTRO, B.; LOURES, L.; RODRIGUES, L. G.; SERENO, A.; FERREIRA JUNIOR, O. C.; FRANCO, L. G.; MULLER, M.; SAMPAIO, D. A.; SANTANA, A.; PASSOS, L. M. & PROIETTI, F. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion* 37(2):242-3, 1997.
- GILL, P.S.; HARRINGTON, W.J.; KAPLAN, M.H.; RIBEIRO, R.C.; BENNET, J.M.; LIEBHMAN, H.A.; BERNSTEIN-SINGER, M.; ESPINA, B.M.; CABRAL, L. & ALLEN, S. et al. Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alpha and zidovudine. *New England Journal of Medicine* 29:332(26):1744-8, 1995.
- 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(4):1016-21, 1996.
- SONOKI, T.; MATSUZAKI, H.; NAGASAKI, A.; HATA, H.; YOSHIDA, M.; MATSUKURA, M.; KURIBAYASHI, N.; KIMURA, T.; HARADA, N.; TAKATSUKI, K.; MITSUYA, H. & MORI, M. Detection of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA by RT-PCR in ATL patients and HTLV-1 infected cell lines: clinical features and apoptosis by NOS inhibitor. *Leukemia* 13(5):713-8, 1999.
- The IFN MS Study Group. IFN beta-1b is effective in relapsing remitting multiple sclerosis. *Neurology* 39: 254-85, 1993.

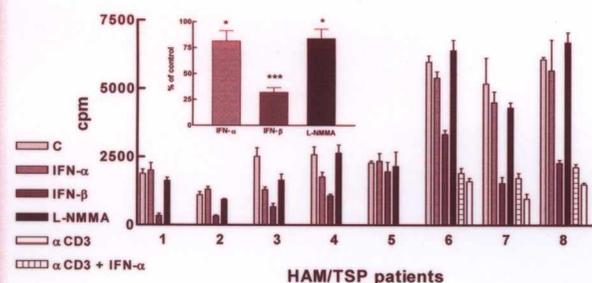
RESULTS: 1

•Inhibitory effect of IFN- α , IFN- β and L-NMMA (iNOS inhibitor) on lymphoproliferation in asymptomatic individuals



RESULTS: 2

•Inhibitory effect of different stimuli on lymphoproliferation in PBMC of HAM patients



ABSTRACT

DIFFERENTIAL EFFECT OF IFN- α , IFN- β AND iNOS INHIBITORS ON LYMPHOCYTE ACTIVATION IN ASYMPTOMATIC AND SYMPTOMATIC HTLV-1 SEROPOSITIVE INDIVIDUAL. Decanine D¹, Kolb JP⁵, Cardoso S¹, Carvalho EM⁴, Galvão-Castro B² & Van Weyenbergh J¹. ¹LIMI, ²LASP- Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, Salvador, Brazil; ³Serviço de Imunologia - HUPES/UFBA; ⁴ U365 INSERM - Institut Curie, Paris, France.

Infection with HTLV-1 provokes strong lymphocyte activation, characterized by spontaneous proliferation and increased cytokine secretion. IFN- α and IFN- β have shown significant clinical benefit in HTLV-1-associated pathologies (ATL and HAM/TSP) and multiple sclerosis, respectively. Recently, the presence of iNOS and its anti-apoptotic effect has been demonstrated in T cell clones derived from patients with ATL. In this study we have compared the effect of IFN- α , IFN- β and iNOS inhibitors *in vitro* on lymphocyte proliferation and cytokine secretion in eight HAM patients and eight asymptomatic individuals. We found that, in asymptomatic individuals, only IFN- α showed a modest inhibitory effect on lymphoproliferation. In HAM patients, both IFN- α and L-NMMA (iNOS inhibitor) demonstrated a discrete but significant inhibitory effect, while IFN- β displayed a profound anti-proliferative effect. Surprisingly, anti-CD3 stimulation induced an even further decrease in proliferation in three out of four patients tested, presumably by triggering activation-induced cell death (AICD). In contrast to their anti-proliferative action, IFN- α and IFN- β as well as iNOS inhibitors failed to inhibit the exacerbated IFN- γ production ($>2ng/ml$) observed in patients, or the low variable IFN- γ production in asymptomatics ($<0,5ng/ml$). Thus, IFN- α and IFN- β display differential biological activities, at least *in vitro*, in distinct patient groups. Our results suggest that IFN- β might possibly be considered as a complementary or alternative therapy in HAM patients. We are currently investigating the expression and function of iNOS and the possible use of its inhibitors to induce apoptosis *in vitro* and eventually *in vivo*.



EFFECT OF VITAMIN C AND INTERFERONS ON LYMPHOCYTE ACTIVATION AND VIRAL ACTIVITY IN HAM/TSP PATIENTS.

Decanine D.¹; Galvão-Castro B.²; Andrade-Filho A.³; Figueiroa F.³; Kolb J.P.⁴ & Van Weyenbergh J.¹

¹LIMI, ²LASP- Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ, ³FNN, Salvador, Brazil; ⁴ U365 INSERM - Institut Curie, Paris, France.

INTRODUCTION

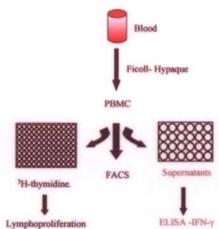
HTLV-1 was the First human retrovirus associated with a malignancy (ATL),amid other pathologies (HAM/TSP, uveitis, infective dermatitis of children and inflammatory and immune-mediated diseases). The seroprevalence in Brazilian blood donors is 0,41% and Salvador has the highest prevalence (1,35%) (Galvão-Castro, 1997). Infection with HTLV-1 cause strong lymphocyte activation and increased cytokine secretion. IFN- α has shown clinical benefit in ATL and HAM/TSP (Izmo, 1996 & Gill, 1995), whereas IFN- β is now widely used in multiple sclerosis, another neurodegenerative disease (The IFN MS study group, 1993). Their mechanism of action *in vivo* remains unclear, but the antiviral, antiproliferative and immunomodulatory properties of both interferons have been extensively documented *in vitro*. However, few data are available in HAM/TSP patients. On the other hand, another drug, vitamin C, has been used in treatment of hepatitis and is now shortly used in HAM/TSP suggesting favorable immuno-modulatory action of therapy in HAM/TSP patients.

OBJECTIVE

• Compare the effect of IFN- α , IFN- β and Vitamin C *in vitro* on lymphocyte proliferation and cytokine secretion in HAM/TSP patients.

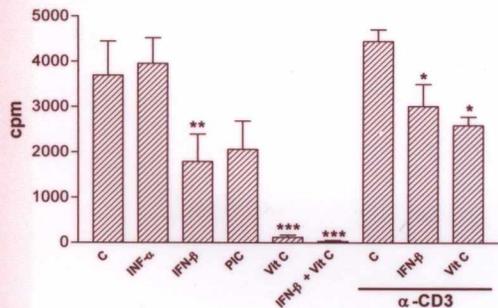
METHODS

- PBMC were isolated by FICOLL-HYPAQUE centrifugation.
- PBMC were cultured in 96-well round-bottom plates for proliferation assay and 24-well plates for quantification of cytokines (ELISA) and FACS analysis.
- Apoptosis related molecules were evaluated by FACS analysis (Facsort Becton & Dickinson) using fluorescent labeled antibodies.
- Effect of IFN- β , Vitamin C and anti-CD3 stimulation in viral transcription were evaluated by RT-PCR analysis (RNAs was extracted with TRIZOL reagent and viral transcription was verified with primers for LTR and TAX - viral proteins).



RESULTS: 1

• Inhibitory effect of IFN- α , IFN- β and Vitamin C on lymphoproliferation in HAM/TSP patients

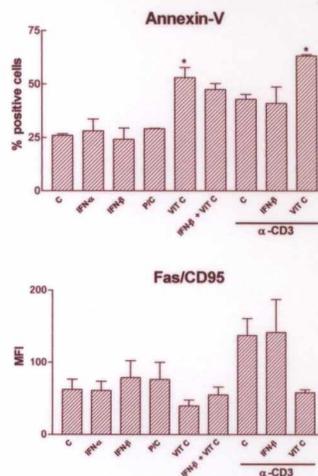


REFERENCES

- GALVÃO-CASTRO, B.; LOURES, L.; RODRIQUES, L. G.; SERENO, A.; FERREIRA JUNIOR, O. C.; FRANCO, L. G.; MULLER, M.; SAMPAIO, D. A.; SANTANA, A.; PASSOS, L. M. & PROJETTI, F. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion* 37(2):242-3, 1997.
- GILL, P.S.; HARRINGTON, W.Jr.; KAPLAN, M.H.; RIBEIRO, R.C.; BENNET, J.M.; LIEBMAN, H.A.; BERNSTEIN-SINGER, M.; ESPINA, B.M.; CABRAL, L. & ALLEN, S. et al. Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alpha and zidovudine. *New England Journal of Medicine* 29:332(26):1744-8, 1995.
- 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-1-associated myelopathy: a multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. *Neurology* 46(4):1016-21, 1996.
- SONOKI, T.; MATSUZAKI, H.; NAGASAKI, A.; HATA, H.; YOSHIDA, M.; MATSUOKA, M.; KURIBAYASHI, N.; KIMURA, T.; HARADA, N.; TAKATSUKI, K.; MITSUYA, H. & MORI, M. Detection of inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA by RT-PCR in ATL patients and HTLV-1 infected cell lines: clinical features and apoptosis by NOS inhibitor. *Leukemia* 13(5):713-8, 1999.
- The IFN MS Study Group. IFN beta-1b is effective in relapsing remitting multiple sclerosis. *Neurology* 39: 254-85, 1993.

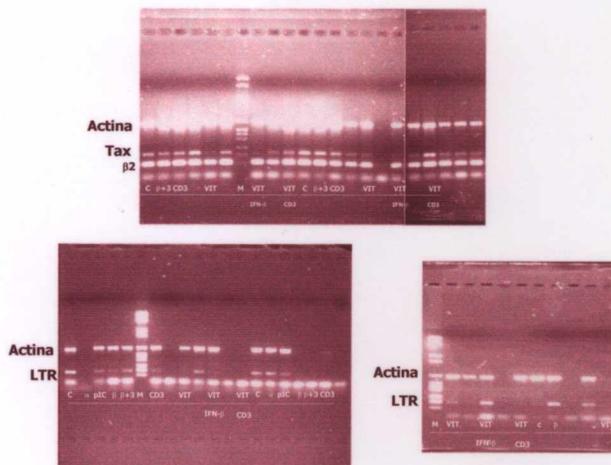
RESULTS: 2

• Expression of apoptosis-related molecules in PBMC of HAM patients



RESULTS: 3

• Effect of Interferon- β and Vitamin C in induced proliferation with anti-CD3 stimulation in Viral transcription in HAM/TSP patients



DISCUSSION

- IFN- β , but not IFN- α , demonstrated a significant inhibitory effect on lymphoproliferation (approximately 60%) in all patients tested, while vitamin C displayed a profound anti-proliferative effect (approximately 90%) and both reduced anti-CD3-induced lymphoproliferation.
- IFN- β and anti-CD3 stimuli was paralleled by a moderate increase in apoptosis (annexin-V staining) and vitamin C displayed a profound pro-apoptotic action.
- However, neither IFN- β , nor anti-CD3 stimulation were able to modulate transcription of viral LTR and pX while vitamin C were able to modulate antiviral activity.
- IFN- β displays significant anti-proliferative effect *in vitro* in HAM/TSP patients, apparently in the absence of antiviral activity, while the vitamin C displays significant anti-proliferative effect and potent antiviral activity.
- Our results suggest that anti-proliferative or apoptosis-inducing factors might be possible candidates for future therapy.

