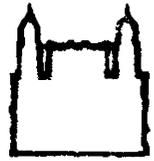




UFBA

**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

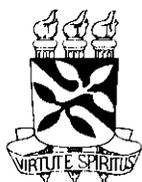
**EFEITOS DE COMPOSTOS QUINOLÍNICOS
SOBRE A INFECÇÃO PELO HTLV-1, *ex-vivo***

ANA BEATRIZ GUIMARÃES CORRÊA

Salvador - Bahia - Brasil

2007





UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de pesquisas Gonçalo Moniz



FIOCRUZ

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

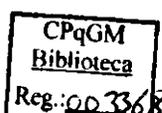
**Efeitos de compostos quinolínicos sobre a infecção pelo
HTLV-1, *ex-vivo***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz com
objetivo de obtenção do título de mestre
em Patologia

ANA BEATRIZ GUIMARÃES CORRÊA

ORIENTADORA: MARIA FERNANDA RIOS GRASSI

Salvador – BA
2007



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

C824e

Corrêa, Ana Beatriz Guimarães

Efeitos de compostos quinolônicos sobre a infecção pelo HTLV-1, *ex-vivo*
[manuscrito] / Ana Beatriz Guimarães Corrêa. - 2006.

70 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Mestrado (dissertação) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz, 2006.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Fernanda Rios Grassi, Laboratório Avançado
de Saúde Pública.

1. HTLV-1. 2. Proliferação celular. 3. Carga viral. 4. Apoptose. 5.
Compostos quinolônicos. I.Título.

CDU 616.98:578.28

LILDBI

PHE
MEN 2350
003368

616.98 578.28
003368

"EFEITOS DE COMPOSTOS QUINOLÍNICOS SOBRE A INFECÇÃO PELO HTLV-1, EX-VIVO".

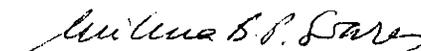
ANA BEATRIZ GUIMARÃES CORRÊA DA SILVA

FOLHA DE APROVAÇÃO

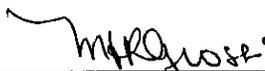
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Carlos Roberto Brites Alves
Professor Adjunto
UFBA



Dra. Milena Botelho Pereira Soares
Pesquisadora Associada
CPqGM-FIOCRUZ



Dra. Maria Fernanda Rios Grassi
Pesquisadora Adjunta
CPqGM-FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao meu anjo da guarda, fiel escudeiro que me acompanhou durante todos os dias, noites e fim de semanas que passei dentro da Fiocruz.

À minha orientadora, Fernanda Grassi, pela confiança em mim depositada, pelo aprendizado científico e emocional.

Ao Dr. Alain Fournet pela generosa colaboração.

Ao Dr. Galvão, pela oportunidade de trabalhar no LASP e no Centro de HTLV.

Ao Dr. Mitermayer pela ajuda e atenção desprendida.

À equipe do Centro de HTLV, especialmente Dra. Ceuci Nunes, Noílson Lázaro e Sonia Rangel.

Aos pacientes, sempre solícitos e sorridentes, mesmo com todas as adversidades da vida.

À Viviana Olavarria e Amália Duarte pela ajuda na realização dos experimentos e amizade.

Ao LIM/LIP, especialmente Jorge Clarêncio pela paciência e bom humor na citometria de fluxo.

Ao LETI, pela generosidade da Dra. Milena Soares e pela incansável leitura de placas realizada por dois cavalheiros, Matheus Sá e Fernando Costa.

À coordenação de ensino pelo excelente desempenho, nas figuras de Rosália e Rosângela.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz por proporcionar um agradável ambiente de trabalho.

Aos colegas do LASP especialmente Elisabeth Mascarenhas pelos ensinamentos.

Aos amigos do coração e do laboratório Luciana Maron e Raimundo Coutinho.

À minha família amada, que tem torcido e acompanhado a distancia minha caminhada.

À Vine e Siomara pela amizade incondicional.

À Josélia pela deliciosa comida e recepção calorosa.

E por fim, ao meu segundo anjo da guarda, Daniel Reis, exemplo de determinação que me conduz com tanto amor e zelo aos meus objetivos.

RESUMO

No Brasil, a prevalência do HTLV-1 é particularmente elevada em Salvador, onde cerca de 2% da população encontra-se infectada. Uma das características imunológicas da infecção pelo HTLV-I é a presença de linfoproliferação espontânea dos linfócitos de indivíduos infectados. Este fenômeno pode ter papel importante no desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV. Recentemente, compostos quinolínicos sintetizados a partir de molécula isolada da planta *Galipea longiflora*, foram descritos como capazes de diminuir a proliferação espontânea em linhagens celulares transformadas pelo HTLV-1. Neste estudo avaliamos a capacidade de 22 compostos quinolínicos sintéticos em inibir a proliferação espontânea em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e os efeitos destes sobre o perfil de secreção de citocinas, a carga proviral e a indução da apoptose. Identificamos 15 compostos não tóxicos. Destes, 4 compostos (**BS74**, **MDS14**, **MDS22** e **MHM22**) inibiram acima de 80% a proliferação espontânea em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV em presença de concentração modo-dependente dos compostos quinolínicos (100 a 0,8 μM). Em presença do composto **MDS14**, a proporção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras de IL-10 foi superior em relação ao controle (p= 0,05 e p= 0,04, respectivamente). O composto **MHM22** diminuiu na carga proviral em 40% (p= 0,027). O composto **BS74** foi capaz de induzir a apoptose em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (p= 0,01) Nossos resultados reforçam que alguns compostos quinolínicos diminuem a proliferação espontânea em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Além disso, estes compostos quinolínicos foram capazes de diminuir a carga proviral e induzir a apoptose de linfócitos. Entretanto, é necessário investigar mecanismos de ação destes compostos sobre os parâmetros avaliados.

ABSTRACT

The prevalence of HTLV-1, in Brazil is particularly higher in Salvador where around 2% of the population is infected. Spontaneous proliferation *in vitro* is the immunological hallmark of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HTLV-I-infected individuals. This phenomenon may play a role in the pathogenesis of HTLV-I-associated diseases. Quinolines are compounds prepared by synthesis from *Galipea longiflora*. Quinolines down regulate *in vitro* cell proliferation of HTLV-I transformed cell lines. To test the capacity of quinolines to inhibit spontaneous cell proliferation of PBMC from HTLV-I infected individuals, we assessed the capacity of 22 quinolines to inhibit spontaneous proliferation of PBMC from HTLV-1-infected individuals and the effect of these quinolines on the cytokine profile, proviral load and apoptosis. Fifteen compounds were classified as non-toxic to PBMC from uninfected individual. Four of these compounds inhibited more than 80% of the spontaneous proliferation: **BS74**, **MDS14**, **MDS22** and **MHM22** in presence of decreasing concentrations of quinolines (from 100 to 0.8 μ M). The proportion of CD4 and CD8 T cells producing IL-10 was higher in presence of quinoline MDS14 ($p= 0.05$ and $p= 0.04$ respectively). MHM22 decreased the proviral load in 40 % ($p=0.027$). BS74 induced apoptosis in PBMC from HTLV-I infected individuals ($p= 0.01$). Our results indicate that some quinolines block the spontaneous proliferation of PBMC from HTLV-I-infected individuals. One of these quinolines was capable of decreasing the proviral load and another induced apoptosis. Further experiments are necessary to investigate the molecular mechanisms involved in these phenomena.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia do HTLV-1.....	17
Figura 2 Estrutura genômica do HTLV.....	17
Figura 3. Processo de interação entre vírus e a célula hospedeira	19
Figura 4. Prevalência da infecção pelo HTLV-1 e 2 no Brasil de 1989 a 1996.....	20
Figura 5. Representação esquemática dos efeitos biológicos de Tax que contribuem para seu efeito oncogênico.....	28
Figura 6. Cinética da proliferação espontânea em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV.....	41
Figura 7. Curva dose-resposta da inibição da proliferação espontânea em presença dos compostos quinolônicos.....	43
Figura 8. Avaliação da carga proviral em PBMC indivíduos cultivados pelo HTLV-1 em presença do composto MHM22.....	46
Figura 9. Avaliação da indução da apoptose em presença do compostos quinolônicos	47

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Viabilidade celular de linfoblastos cultivados em presença de compostos quinolínicos.....40
- Tabela 2.** Atividade antiproliferativa dos compostos quinolínicos em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1.....42
- Tabela 3** Proporção de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ , TNF- α e IL-10 em presença dos compostos quinolínicos.....45

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ATLL	Leucemia/linfoma de células T do adulto (Adult T cell leukemia/lymphoma)
AZT	Zidovudina
CD	Marcador de membrana celular (Cluster of differentiation)
CD25	Marcador de células T
CTL	Linfócitos T citolíticos (cytolytic T lymphocytes)
cpm	Contagens por minuto
CPV	Carga proviral
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Técnica de ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético Sódico
GLUT	Transportador de glicose (ubiquitous transporter)
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos
HAM/TSP	Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical
HLA	Complexo gênico de antígenos leucocitários humanos
HLA-DR	Antígenos leucocitários humanos de classe II, DR
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTLV	Vírus linfotrópico de células T humanas
IE	Índice de estimulação
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IL-2R	Receptor de interleucina-2
IL-2R α	Receptor da cadeia alfa da interleucina-2
JAK	Receptor de tirosina cinase (Janus Kinase)
LTR	Seqüências terminais repetitivas (long terminal repeats)
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal
μ g	Microgramas
mg	Miligramas
μ L	Microlitros

mL	Mililitros
μ M	Micromolar
mM	Mili molar
mRNA	RNA mensageiro
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear (nuclear factor kappa B)
pb	Pares de base
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (peripheral blood molecular cells)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFA	Paraformaldeído
PPD	Teste intradérmico da tuberculina
RNA	Ácido ribonucléico
STAT	Transdutor de sinal (signal transducers and activators of transcription)
Th1	Linfócitos T auxiliares (T CD4 inflamatórios) do tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares (T CD4 auxiliares) do tipo 2
TGF- β	Fator de crescimento e transformação beta
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.2 Morfologia e Estrutura Genômica do HTLV	16
2.3 Ciclo Viral	18
2.4 Epidemiologia do HTLV-1.....	19
2.5 Vias de Transmissão.....	21
2.6 Diagnóstico Laboratorial do HTLV	22
2.7 Doenças associadas ao HTLV	23
2.7.1 Mielopatia Associada ao HTLV ou Paraparesia Espástica Tropical	23
2.7.2 Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL)	23
2.7.3 Outras doenças associadas ao HTLV-1.....	24
2.7.4 Associação entre HTLV-1 e Doenças Infecciosas	24
2.8 Resposta imune e patogênese da infecção.....	25
2.9 Tratamento.....	29
2.9.1 Compostos Quinolínicos	31
3. JUSTIFICATIVA	33
4. OBJETIVOS.....	34
5. PACIENTES E MÉTODOS.....	35
5.1 Pacientes.....	35
5.2 Células	35
5.3 Compostos Quinolínicos.....	35
5.4 Avaliação da Viabilidade Celular	36
5.5 Linfoproliferação	36
5.6 Detecção intracelular de citocinas	37
5.7 Detecção de Carga Proviral	37
5.8 Quantificação da apoptose.....	38
5.9. Análise Estatística	38
6. RESULTADOS	39
6.1 Avaliação da toxicidade celular dos compostos quinolínicos	39
6.2 Avaliação da atividade inibitória dos compostos quinolínicos na linfoproliferação de indivíduos infectados pelo HTLV-1.....	41
6.3 Avaliação do perfil de citocinas em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em presença dos compostos quinolínicos inibidores da proliferação espontânea.	44
6.4 Avaliação da carga proviral em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em presença dos compostos quinolínicos inibidores da proliferação espontânea.	46

6.5 Avaliação da indução da apoptose em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em presença dos compostos quinolônicos inibidores da proliferação espontânea.	47
7. <i>DISCUSSÃO</i>	48
8. <i>CONCLUSÕES</i>	52
9. <i>REFERÊNCIAS</i>	53

1. INTRODUÇÃO

Estima-se em 10-20 milhões o número de indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico humano de células T (HTLV), sobretudo em países do terceiro mundo (EDLICH; ARNETTE; WILLIAMS, 2000). No Brasil, a prevalência em doadores de sangue atinge 0,45%, variando segundo a região estudada: de 0,08 no Sul a 1,35 em Salvador-Bahia, que apresenta as maiores taxas de infecção do país (GALVAO-CASTRO et al., 1997). Recentemente, um estudo de base populacional demonstrou que a prevalência desta infecção na população geral de Salvador é em torno de 2% (DOURADO et al., 2003).

Classicamente, o HTLV é descrito como o agente etiológico da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) (HINUMA et al., 1981) e da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV (HAM/TSP) (GESSAIN et al., 1985). Outras patologias inflamatórias como uveítes, poliartrites, Síndrome de Sjogren e alveolites têm sido igualmente relacionadas ao HTLV. Estudos realizados no Japão indicam que a maioria dos indivíduos soropositivos permanece assintomática, apenas <5% desenvolve enfermidades. Entretanto, desconhecemos a taxa de desenvolvimento de doenças em nosso meio, assim como os mecanismos implicados nesta progressão.

Uma das observações imunológicas mais importantes na infecção pelo HTLV-1 é a presença, *in vitro*, de proliferação espontânea dos linfócitos T (PRINCE et al., 1990). Esta proliferação está associada a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, como INF- γ , TNF- α e IL-6, as quais são consideradas importantes mediadores inflamatórios no desenvolvimento de HAM/TSP (KUBOTA et al., 1998).

O tratamento da infecção pelo HTLV-1 está indicado apenas para as doenças associadas. Para o tratamento de HAM/TSP, diferentes regimes terapêuticos têm sido propostos, no entanto existem poucos estudos demonstrando a eficácia destes. O tratamento da ATLL com quimioterapia convencional tem poucos benefícios uma vez que as células infectadas pelo HTLV são resistentes às drogas indutoras de apoptose.

Os compostos quinolínicos, alcalóides extraídos de uma planta da Amazônia boliviana, têm demonstrado atividade, *in vitro*, contra diferentes protozoários e para o

tratamento de co-infecções HIV-HTLV (FAKHFAKH et al., 2003). Mais recentemente, estes derivados têm sido utilizados em linhagens celulares infectadas pelo HTLV, diminuindo a proliferação espontânea (FOURNET et al., 2003).

No presente estudo nos propusemos a avaliar a capacidade de inibição da proliferação linfocitária em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1, por compostos quinolínicos sintéticos. Identificamos os compostos inibidores da proliferação espontânea e avaliamos seus efeitos sobre o perfil de produção de citocinas (IFN- γ e TNF- α , IL-10), sobre a carga proviral e sobre a indução da apoptose. A realização deste estudo permitirá identificar drogas potencias para o tratamento da infecção pelo HTLV.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

O vírus linfotrópico de células T humana (HTLV) é um retrovírus que pertence à família Retroviridae, composta pelas subfamílias Lentivirinae, Spumavirinae e Orthoretrovirinae. A subfamília Lentivirinae é formada pelos lentivírus (vírus lentos), que causam patologias graves após um longo período de infecção, os vírus da imunodeficiência humana (HIV) do tipo 1 e 2, agentes etiológicos da síndrome da imunodeficiência adquirida são representantes desta subfamília. Os vírus da subfamília Spumovirinae (vírus espumosos) embora descritos em humanos, não são associados a nenhuma doença conhecida. A subfamília Orthoretrovirinae é formada por vírus que apresentam oncogenes, seqüências de ácidos nucleicos que geram produtos capazes de induzir o aparecimento de neoplasias em animais e humanos. Os HTLV-1 e 2 foram os primeiros oncovírus descritos como patogênicos em humanos (KALYANARAMAN et al., 1982).

O HTLV-1 foi isolado inicialmente nos Estados Unidos, a partir de uma linhagem de células linfoblastóides, obtida de um paciente com linfoma cutâneo de células T (POIESZ et al., 1980). O HTLV-2 foi isolado posteriormente, a partir de linfócitos T de um paciente com diagnóstico de tricoleucemia (leucemia de células pilosas) (KALYANARAMAN et al., 1982). Recentemente, dois novos tipos de HTLV foram descobertos. O HTLV-3 e o HTLV-4 foram isolados em amostras de sangue de moradores de Camarões na África Central (CALATTINI et al., 2005; WOLFE et al., 2005). Estudos estão sendo realizados para elucidar as características moleculares destes vírus, associá-los a propriedades oncogênicas e a doenças humanas, assim como para investigar o modo como são transmitidos (MAHIEUX; GESSAIN, 2005).

A infecção pelo HTLV-1 está distribuída em diversas áreas geográficas afetando grupos populacionais distintos. Embora a maior parte dos indivíduos infectados não desenvolva doença, este vírus é o agente etiológico de patologias graves que acometem principalmente as populações mais carentes e atingem indivíduos em idade produtiva. Além das neoplasias hematológicas, como a ATLL descrita acima, o vírus é o agente etiológico da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) (GESSAIN

et al., 1985; OSAME et al., 1986), uma doença neurológica que debilita as funções motoras dos membros inferiores, muitas vezes impedindo a deambulação, e de outras patologias como: uveíte associada ao HTLV, anormalidades dermatológicas, oftalmológicas e imunológicas, como será descrito posteriormente.

A infecção pelo HTLV-2 é mais freqüente em usuários de drogas injetáveis co-infectados pelo HIV (LEE et al., 1990), além das populações de tribos ameríndias (LAIRMORE et al., 1990). Apesar de possuir grande homologia com o HTLV-1, ele não está claramente associado a nenhuma doença humana até o momento. Entretanto, várias alterações neurológicas são descritas em pacientes cronicamente infectados, incluindo entidades semelhantes a HAM/TSP (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002).

2.2 Morfologia e estrutura genômica do HTLV

A morfologia do HTLV é semelhante à dos demais retrovírus (**Figura 1**). O HTLV tem um genoma de RNA diplóide, flanqueado por seqüências não codificantes e uma seqüência repetitiva em ambas extremidades, chamada de LTR (long terminal repeats). Estas são essenciais para a integração do DNA proviral ao DNA cromossômico do hospedeiro e também na regulação transcricional do genoma do HTLV. As seqüências codificantes são os genes: *gag* (grupo antígeno-específico), que codifica proteínas da matriz (p19), do capsídeo (p24), do nucleocapsídeo (p15), *pol* (polimerase/integrase) que codifica as enzimas transcriptase reversa (p55), endonuclease (RNase H) e a integrase; (p32) *env* (envelope), que codifica as glicoproteínas gp46 e gp21 presentes respectivamente, na superfície e na transmembrana do envelope viral.

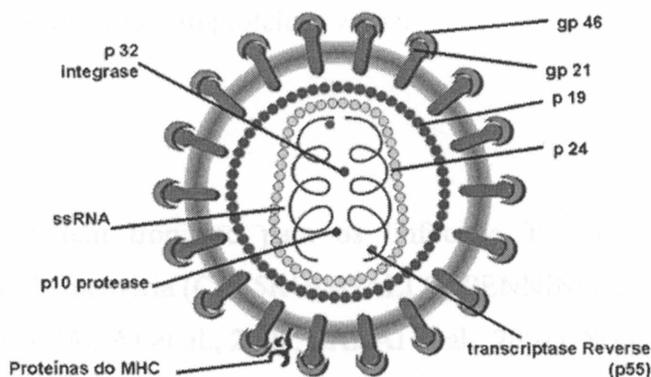


Figura 1. Morfologia do HTLV-1

Fonte: www.htlv.com.br

Além destas regiões comuns a todos os retrovírus, o HTLV possui uma região adicional denominada pX localizada entre o gene *env* e a terminação 3' da região LTR. A região pX contém quatro fases de leitura aberta (ORFs), ORFsI, ORFsII, ORFsIII, ORFsIV. Os fragmentos mais estudados são o III e o IV por codificarem as proteínas virais regulatórias Tax (p40) e Rex (p27), respectivamente (**Figura 2**)

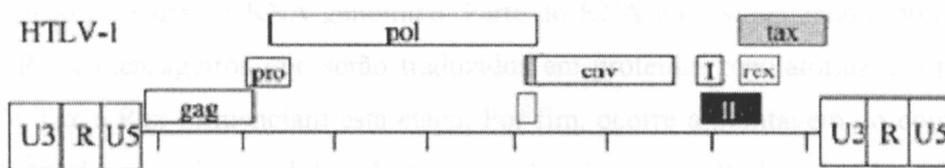


Figura 2 Estrutura genômica do HTLV

Fonte: *adaptado de Feuer e Green (2005)*

Tax é considerada uma proteína transativadora, pois além de regular a expressão de genes da região LTR do vírus, interage com fatores de transcrição e genes da célula hospedeira. Esta proteína é fundamental nas alterações imunológicas e moleculares induzidas pelo vírus, como será detalhado posteriormente. Rex atua promovendo o

processamento e a exportação dos RNAs virais do núcleo para citoplasma (HIDAKA et al., 1988), onde serão traduzidos em proteínas virais.

2.3 Ciclo viral

O HTLV-1 tem tropismo para os linfócitos T, infectando preferencialmente linfócitos T CD4⁺ de memória (CD45RO) (GALLO; PENNING; HANSON, 1991), além de linfócitos T CD8⁺ (NAGAI et al., 2001; SAKAI et al., 2001). Secundariamente, o HTLV-1 pode infectar outros tipos celulares como células dendríticas e células da glia (HIRAYAMA et al., 1988; HOFFMAN et al., 1992; MACATONIA et al., 1992).

A infecção inicia-se quando a partícula viral liga-se à superfície da membrana celular, através da interação entre as glicoproteínas do envelope viral e o receptor de superfície celular GLUT-1 (**Figura 3**), que é um transportador ubiquitário de glicose (MANEL et al., 2003). Após esta ligação, ocorre a fusão entre as membranas viral e celular e a penetração do core viral no interior da célula. A transcrição do genoma viral de RNA para DNA é realizada pela enzima transcriptase reversa. Durante a transcrição reversa, o RNA genômico é removido pela atividade RNase H da transcriptase reversa viral. A fita dupla de DNA linear migra para o núcleo e integra-se ao genoma do hospedeiro pela ação da integrase viral. Uma vez integrado, o provírus utiliza a maquinaria celular para a transcrição primária do RNA genômico. Parte do RNA viral sintetizado é processado para gerar RNA mensageiros que serão traduzidos em proteínas regulatórias. As proteínas do HTLV Tax e Rex influenciam esta etapa. Por fim, ocorre a montagem do core viral e sua liberação da superfície celular. Entretanto, *in vivo*, a multiplicação do HTLV ocorre predominantemente devido à expansão clonal das células infectadas, via mitose (WATTEL et al., 1996) e não pelo brotamento através da membrana plasmática, a exemplo do HIV. Por esta razão, a proporção de partículas de HTLV livres no plasma é quase indetectável. Para mensurar apropriadamente a carga viral do HTLV é necessário quantificar a proporção de células contendo um provírus (carga proviral).

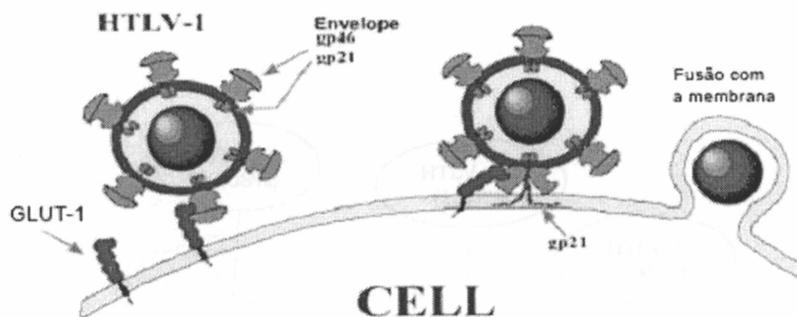


Figura 3. Processo de interação entre vírus e a célula hospedeira.

Fonte: modificado de <http://www.dundee.ac.uk>

Aproximadamente 1-5% de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos contém DNA proviral integrado ao genoma do hospedeiro (Bangham et al., 1999) Em PBMC de pacientes com HAM/TSP, esta proporção é geralmente maior (NAGAI et al., 1998; BEST et al., 2006), sobretudo na subpopulação T CD4⁺ (SIBON et al., 2006).

2.4 Epidemiologia do HTLV-1

Estima-se que 10-20 milhões de pessoas por todo o mundo estejam infectadas pelo HTLV (EDLICH; ARNETTE; WILLIAMS, 2000). As áreas de maior prevalência da infecção são: Japão, Caribe, África Equatorial, Melanésia e partes da América do Sul (FERREIRA; PLANELLES; ROSENBLATT, 1997). No entanto, a prevalência nessas áreas endêmicas não é uniforme, podendo variar de uma região, de um mesmo país.

No Brasil, o HTLV-1 foi descrito primeiramente entre imigrantes japoneses da cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, com uma prevalência de 13 % para o vírus nesta população (KITAGAWA et al., 1986). Posteriormente, um estudo multicêntrico em doadores de sangue demonstrou que o HTLV estava presente em todas as regiões do país, estimando uma prevalência média de infecção de 0,41%. Entretanto, esta prevalência variava de acordo com a região estudada: 0,08% em Florianópolis (Sul), 0,33% no Rio de Janeiro (Sudeste), 0,33% em Recife (Nordeste). A maior prevalência foi observada em

Salvador, onde 1,35% dos doadores estavam infectados (GALVAO-CASTRO et al., 1997) (Figura 4).

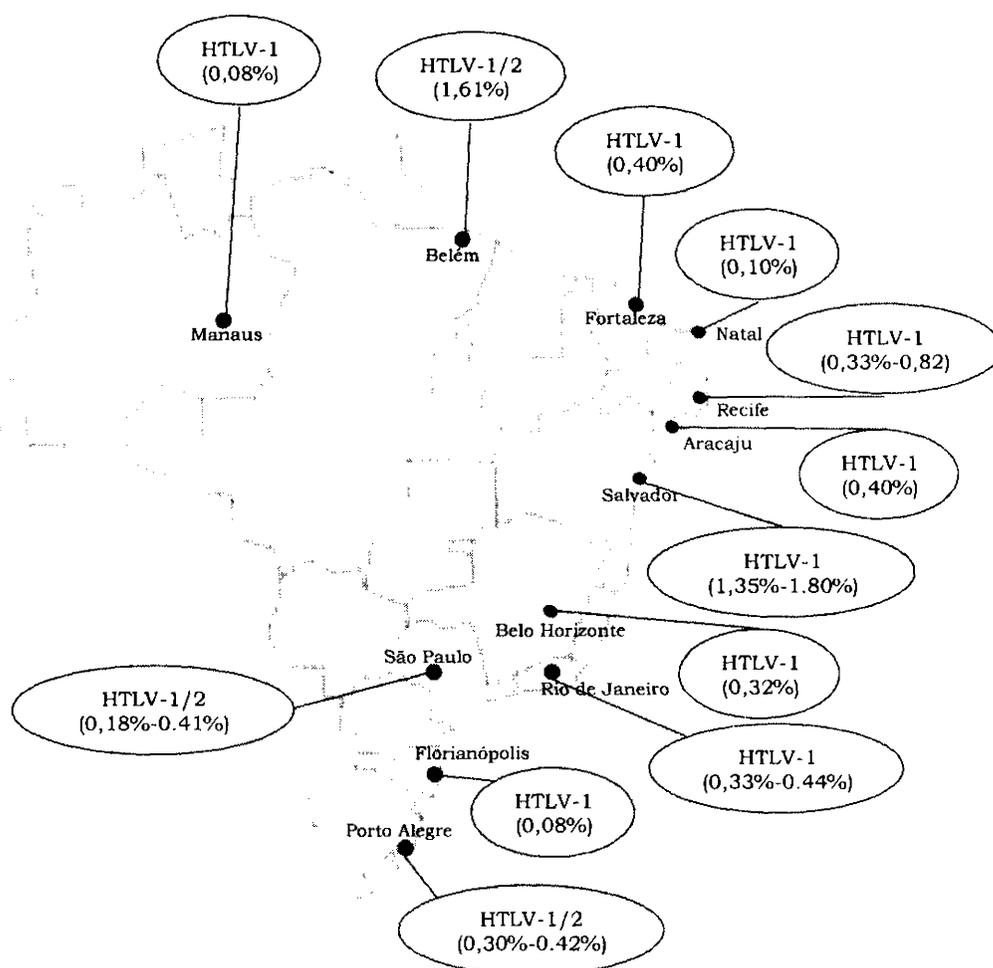


Figura 4. Prevalência da infecção pelo HTLV-1 e 2 no Brasil de 1989 a 1996.

Fonte: adaptado de Carneiro-Proietti et al., 2002

Em 1999, um estudo realizado no centro histórico de Salvador, com o objetivo de investigar a prevalência da infecção entre usuários de drogas intravenosas, encontrou uma prevalência global de 22% de infecção pelo HTLV-1. No sexo masculino esta prevalência foi de 10,3% atingindo 46,2% das mulheres (DOURADO et al., 1999). Em 2001, um estudo em gestantes de Salvador revelou uma taxa de infecção de 0,84% (BITTENCOURT et al., 2001). Além disso, estudos sorológicos realizados nesta cidade demonstraram que este vírus é igualmente uma causa freqüente de mielopatia crônica (HAM/TSP), onde cerca de 50% dos pacientes portadores de mielopatia possuíam sorologia positiva para o HTLV-1

(GOMES et al., 1999). A infecção por este retrovírus está igualmente implicada na etiologia de ATLL, em nossa cidade (BARBOSA et al., 1999).

Mais recentemente, um estudo de base populacional confirmou que Salvador apresenta elevadas taxas de infecção pelo HTLV, e permitiu melhor caracterizar o perfil sócio-econômico dos indivíduos infectados. A prevalência da infecção na população geral foi de 1,76%. Esta prevalência, entretanto, é maior entre as mulheres e aumenta com a idade, cerca de 10% das mulheres acima de 50 anos estavam infectadas. Estima-se que, em Salvador, aproximadamente 40,000 indivíduos estejam infectados pelo HTLV-1. As mais altas taxas de prevalência foram obtidas entre os indivíduos com menor renda salarial, menores níveis educacionais e piores condições de vida (DOURADO et al., 2003)

Estes dados indicam que a infecção pelo HTLV-1, apesar de presente em vários continentes, predomina em algumas áreas geográficas e em alguns grupos populacionais restritos. No Brasil, a distribuição da infecção pelo HTLV comporta-se da mesma forma. As maiores taxas da infecção são descritas em Salvador.

2.5 Vias de transmissão

A transmissão do HTLV-1 ocorre através de diferentes vias: vertical, horizontal e parenteral.

A transmissão vertical, da mãe para o filho, ocorre em 20% dos filhos das mães infectadas e tem sido relacionada à carga proviral elevada e altos títulos de anticorpos (KINOSHITA et al., 1984) (URETA-VIDAL et al., 1999). A transmissão intra-uterina e no momento do parto são pouco freqüentes e não existe evidências do vírus em placentas de mulheres infectadas pelo HTLV (BITTENCOURT et al., 2001). A amamentação constitui a principal via de transmissão em áreas endêmicas (HINO et al., 1987). Períodos prolongados de amamentação aumentam o risco de infecção (FURNIA et al., 1999; SAITO, S. et al., 1990; SAJI et al., 1989). Recentemente foram descritos casos de bebês de mães soronegativas infectados através do leite de 'amas de leite' (RIBAS; MELO; CATALAN-SOARES, 2003). No Japão, o aconselhamento para evitar a amamentação em mulheres

soropositivas diminuiu a taxa de infecção entre as crianças amamentadas artificialmente (HINO et al., 1987).

A transmissão por contato sexual (horizontal) parece ser mais freqüente do homem infectado para mulher (MURPHY et al., 1989). A chance de infecção pelo HTLV-1 a cada ano, quando apenas um dos parceiros é infectado pelo HTLV-1 é de 4 a 9% para as mulheres e de 1 a 2% para os homens (STUVER; MUELLER, 1995; STUVER et al., 1993). A presença de outras doenças sexualmente transmissíveis, em especial lesões genitais ulceradas no sexo masculino e lesões inflamatórias nas mulheres, aumenta o risco de transmissão.

Dentre as vias descritas acima, a transmissão parenteral é a mais eficaz e ocorre através de componentes do sangue contaminados. A transfusão de sangue contaminado foi no passado responsável por diversos casos de infecção pelo HTLV sendo a taxa de soroconversão para o indivíduo receptor do material contaminado de 40-60% (MANNIS et al., 1992; OKOCHI; SATO, 1984). A transmissão sanguínea parece também levar mais rapidamente ao desenvolvimento de HAM/TSP (OSAME et al., 1986; SULLIVAN et al., 1991). No Brasil, desde 1993 é realizada a triagem sorológica obrigatória nos bancos de sangue. O compartilhamento de agulhas e seringas entre usuários de drogas injetáveis também constitui uma forma de infecção pelo HTLV.

2.6 Diagnóstico laboratorial do HTLV

O diagnóstico sorológico da infecção pelo HTLV está fundamentado na detecção de anticorpos específicos ao vírus. Os métodos sorológicos podem ser classificados em duas categorias: os testes de triagem e os confirmatórios. Para triagem dos pacientes positivos o mais usado é o ensaio imunoenzimático (ELISA). Este ensaio detecta anticorpos contra o HTLV-1 e 2, porém não apresenta capacidade discriminatória entre essas infecções. Para confirmar e distinguir a infecção causada pelo HTLV-1 daquela causada pelo HTLV-2 é utilizado o *Western blot*, um ensaio de alta especificidade. Caso o resultado sorológico seja duvidoso, pode-se recorrer ao diagnóstico molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para confirmar ou afastar a hipótese de infecção.

2.7 Doenças associadas ao HTLV

A maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanece assintomática, apenas <5% desenvolve alguma das enfermidades clássicas associadas ao vírus. Entretanto várias outras doenças têm sido associadas ao HTLV-1. À medida que os estudos se desenvolvem, torna-se evidente que a doença pode ser sistêmica, evoluindo provavelmente para o conceito de síndrome (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002).

2.7.1 Mielopatia associada ao HTLV ou paraparesia espástica tropical

A HAM/TSP constitui uma mieloneuropatia progressiva caracterizada por uma lesão inflamatória e desmielinizante dos neurônios motores longos da medula. Esta mielopatia tem uma evolução lenta e progressiva. Afeta entre 0,2 a 5% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 (KAPLAN, 1993). A maior ocorrência é entre mulheres, na proporção de um homem para duas mulheres acometidas com HAM/TSP (NAKAGAWA et al., 1995). Classicamente, o aparecimento de HAM/TSP ocorre na quarta década de vida (VERNANT et al., 1987) e caracteriza-se pela diminuição progressiva da força muscular dos membros inferiores com espasticidade, hiperreflexia, incontinência ou retenção urinária, obstipação intestinal, diminuição da libido, disfunção erétil e frigidez sexual, sinal de Babinski, acarretando grande morbidade para os pacientes acometidos pela doença.

2.7.2 Leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL)

Esta doença é caracterizada pela proliferação maligna dos linfócitos T CD4⁺ maduros. A maior incidência de ATLL ocorre a partir da terceira década de vida, tendo sua expressão máxima em indivíduos de 40 a 60 anos de idade (TAKATSUKI, 1995). No Brasil o HTLV é responsável por cerca de 30% das doenças linfoproliferativas de células T (POMBO DE OLIVEIRA et al., 1995). A probabilidade de um indivíduo infectado desenvolver a ATLL durante sua vida é de aproximadamente 3% (MURPHY et al., 1989). As formas clínicas desta doença são divididas em 4 estágios de evolução. A forma denominada *smoldering* é caracterizada por lesões na pele resistentes ao tratamento, raros linfócitos atípicos e ausência de linfocitose. Essa forma pode passar despercebida por

vários anos, podendo evoluir para as formas crônica ou aguda em tempo variado de 10 a 15 anos. A forma crônica é caracterizada por linfocitose absoluta das células T CD4⁺, infecções oportunistas e infiltrado pulmonar intersticial. A forma linfomatosa é indistinguível de outros tipos de linfoma não-Hodgkin. Na forma aguda de ATLL ocorre leucositose com células linfóides atípicas (do tipo *flower cells*) e hipercalcemia. A forma aguda possui alta letalidade, com sobrevida média de seis meses após o diagnóstico. A causa do óbito é a proliferação exacerbada de células tumorais, hipercalcemia e diversas infecções oportunistas.

2.7.3 Outras doenças associadas ao HTLV-1

A infecção pelo HTLV-1 esta relacionada a várias outras patologias inflamatórias como polimiosites (MORGAN et al., 1989), poliartrite (IJICHI et al., 1990; KITAJIMA et al., 1989) e uveíte (MOCHIZUKI et al., 1992). A uveíte associada ao HTLV-1 é caracterizada por uma infiltração dos tecidos oculares, particularmente no corpo vítreo e uma vasculite retiniana moderada. A dermatite infectiva acomete principalmente crianças, caracterizada por eczema crônico e recorrente do couro cabeludo, das regiões retroauriculares e do pescoço associada a uma infecção resistente por cepas de estafilococos ou estreptococos não virulentas (LAGRENADE et al., 1990). A dermatite infectiva é considerada como fator prognóstico para o desenvolvimento de HAM/TSP em crianças e adolescentes (GONCALVES et al., 2000; HANCHARD et al., 1991; PRIMO et al., 2005).

2.7.4 Associação entre HTLV-1 e doenças infecciosas

Além das patologias classicamente associadas ao HTLV-1 descritas anteriormente, a co-infecção entre o HTLV e outros patógenos tem sido relacionada a uma maior morbidade e mortalidade de outras doenças infecciosas, particularmente tuberculose, hanseníase, estrongiloidíase disseminada e escabiose.

Em relação à tuberculose, o primeiro estudo de prevalência demonstrou que em um serviço de referência de Salvador, cerca de 11% dos pacientes hospitalizados com a

enfermidade estavam infectados pelo HTLV-1 (MOREIRA et al., 1993). Além disso, pacientes co-infectados por HTLV-1/tuberculose têm uma maior mortalidade devido à tuberculose (25%), comparada à tuberculose isolada (0,8%) (PEDRAL-SAMPAIO et al., 1997). Recentemente, um estudo caso-controle, realizado também em Salvador, demonstrou um risco três vezes maior para o desenvolvimento de tuberculose em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (MARINHO et al., 2005). Além disso, uma supressão da reação de hipersensibilidade tardia à tuberculina (PPD) tem sido relatada em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (MURAI et al., 1990; WELLES et al., 1994).

Tem sido descrita uma maior frequência de hanseníase em indivíduos infectados pelo HTLV-1, embora uma maior gravidade em co-infectados HTLV-*Mycobacterium leprae* não tenha sido claramente demonstrada (MARSH, 1996). Estudos realizados em diversas partes do mundo revelam que pacientes com hanseníase apresentam uma prevalência média de 8% de infecção pelo HTLV-1 (KASHALA et al., 1994; MUNEISHI et al., 1998).

A interação entre infecção pelo HTLV-1 e *Strongyloides stercoralis* tem sido estudada. Indivíduos infectados pelo HTLV-1 têm um maior risco de adquirir a infecção pelo parasita. Além disso, o risco de desenvolver a forma disseminada da estrogiloidíase e infecções recorrentes é maior nos indivíduos co-infectados (PORTO, M. A. et al., 2002). Tem sido relatado igualmente, que indivíduos co-infectados por HTLV-1 e *Schistosoma mansoni* têm uma menor capacidade de eliminar os parasitas (PORTO, A. F. et al., 2004).

A escabiose disseminada também tem sido relatada em pacientes infectados pelo HTLV-1 com elevada frequência (BLAS et al., 2005; BRITES et al., 2002; TAKESHITA; TAKESHITA, 2000), inclusive em nosso meio, onde observou-se uma prevalência elevada de infecção pelo HTLV-1 em pacientes com sarna norueguesa, uma forma grave da escabiose (BRITES et al., 2002).

2.8 Resposta imune e patogênese da infecção

A infecção pelo HTLV-1 desencadeia uma resposta imune humoral e celular. Não está claro o papel da resposta humoral na proteção contra a infecção e/ou no desenvolvimento de doença. Os títulos de anticorpos estão relacionados à carga proviral elevada e ao desenvolvimento de doença, particularmente HAM/TSP (BANGHAM; OSAME, 2005). A resposta humoral inicial é composta de anticorpos contra a proteína *Gag*, predominante nos dois primeiros meses pós-infecção. Subseqüentemente, são produzidos anticorpos contra proteínas do envelope (*env*) e Tax. Os anticorpos anti-tax são encontrados em metade dos indivíduos infectados (MANNNS et al., 1991)

A resposta celular é mediada por linfócitos T CD4⁺ auxiliares e T CD8⁺ citolíticos (CTL) específicos contra peptídeos virais. As células T auxiliares (Th) do tipo 1 produzem citocinas pró-inflamatórias como interferon (IFN) γ , fator de necrose tumoral (TNF) α e interleucina (IL) 1. As células T CD4⁺ Th2 produzem as citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 e são responsáveis pela ativação e produção de anticorpos pelos linfócitos B. A eficiência da resposta CTL específica anti-HTLV de cada indivíduo parece ter importância no desfecho da infecção, diminuindo o número de células T CD4⁺ infectadas pelo HTLV, ou seja, a carga proviral (BANGHAM; OSAME, 2005). Durante a fase crônica da infecção, existe uma forte resposta imune celular contra o vírus. Entretanto, esta resposta além de destruir as células infectadas pelo vírus, pode contribuir para o dano tecidual resultante da resposta inflamatória. Níveis elevados de CTL no sangue periférico, no liquor e na medula de pacientes com HAM/TSP e a ausência de forte resposta CTL específica, especialmente CTL anti-Tax, em indivíduos assintomáticos reforçam a idéia da contribuição destes linfócitos na patogênese da HAM/TSP (BARMAK; HARHAJ; WIGDAHL, 2003; BIDDISON et al., 1997). Por outro lado, outros autores sugerem que CTL pode ter um papel fundamental na redução da carga proviral do HTLV-1, diminuindo assim o risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias, como a HAM/TSP (HANON et al., 2000).

Fatores do hospedeiro como o haplótipo de HLA influenciam a progressão para a doença (BARMAK et al., 2003). Os haplótipos de pacientes com diagnóstico de HAM/TSP têm alelos DRB1-DQB1 diferentes e associados a uma resposta imune intensa (SONODA; FUJIYOSHI; YASHIKI, 1996). Outros estudos mostraram que indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1, que expressam HLA-A*2 e/ou HLA-Cw*08, têm uma menor carga proviral e um risco menor de desenvolver HAM/TSP (JEFFERY et al., 1999, 2000).

Um aumento na carga proviral tem sido relatado em indivíduos infectados com manifestações clínicas, como HAM/TSP, artrite, uveíte e acometimento pulmonar. (SUGIMOTO, 1993; YAKOVA et al., 2005).

1.8.1. Proliferação espontânea

Uma das alterações imunológicas mais importantes na infecção pelo HTLV é a observação, *in vitro*, de proliferação espontânea dos linfócitos T (PRINCE et al., 1990). Isso significa que, mesmo na ausência de estímulos antigênicos ou de suplementação de citocinas como IL-2, as células dos indivíduos infectados proliferam.

A proliferação espontânea é observada em PBMC de cerca de 50% dos indivíduos infectados pelos HTLV-1 (PRINCE, et al., 1990). As subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória (CD45RO) são as principais células envolvidas neste fenômeno (PRINCE, H. E. et al., 1995). Estas expressam os marcadores de ativação celular CD25 e HLA-DR (PRINCE; JENSEN; YORK, 1992; PRINCE; WEBER; JENSEN, 1991). Concentrações elevadas de citocinas como IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10, entre outras, têm sido relatadas tanto em pacientes com HAM/TSP, quanto em indivíduos assintomáticos (BIDDISON et al., 1997; CARVALHO et al., 2001; JACOBSON et al., 1990; NISHIURA et al., 1996). Outros estudos apontam para uma maior produção destas citocinas em pacientes com HAM/TSP (GOON et al., 2003; NAKAMURA et al., 2000; SANTOS et al., 2004). Diversos autores relatam uma maior intensidade dos níveis de proliferação espontânea em pacientes com HAM/TSP (ITOYAMA et al., 1988; JOHNSON et al., 1988). Entretanto, maior intensidade de proliferação espontânea também foram descritos por diversos grupos em indivíduos assintomáticos (KRAMER et al., 1989; MASCARENHAS et al., 2006; PRINCE et al., 1990).

A associação entre HTLV-1 e maior morbi-mortalidade de doenças infecciosas sugere que a infecção possa induzir um grau de imunossupressão. Recentemente foi demonstrado que PBMC de indivíduos infetados pelo HTLV-1 apresentam uma diminuição dos índices de estimulação aos antígenos de memória, mesmo na ausência de proliferação espontânea (MASCARENHAS et al., 2006).

A proteína Tax tem sido implicada no mecanismo de proliferação de linfócitos em pacientes infectados pelo HTLV-1. Tax não é considerada uma oncoproteína propriamente dita, porém, seus efeitos pleiotrópicos, ou seja, sua ação em diversos genes são capazes de alterar a homeostasia celular, como será descrito (Figura 5).

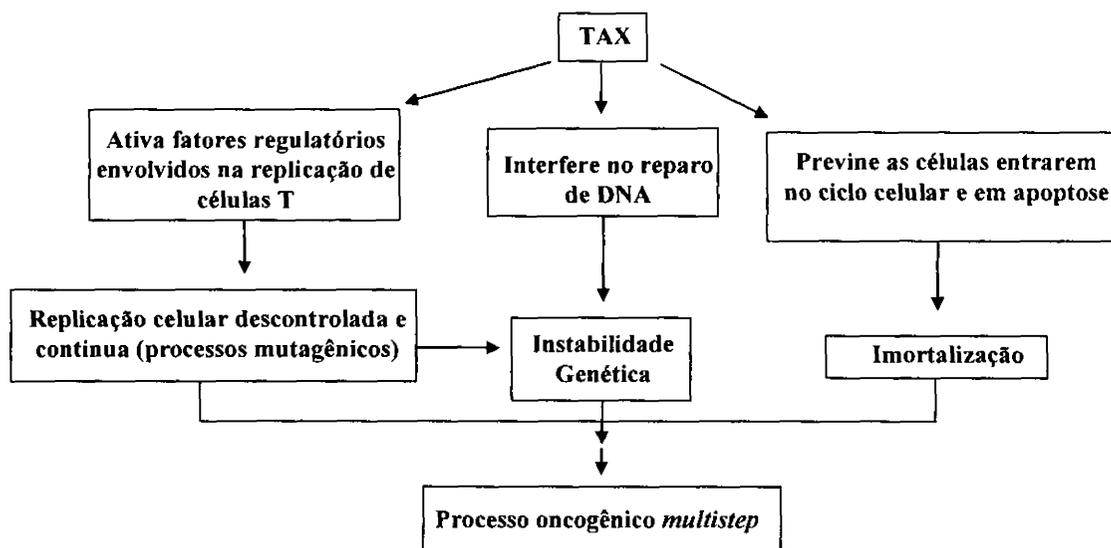


Figura 5. Representação esquemática dos efeitos biológicos de Tax que contribuem para seu efeito oncogênico. Fonte: *adaptado de Retrovirology 2004, 1:20*

Tax ativa um grande número de genes que são reguladores da proliferação celular incluindo citocinas como TNF- α , IL-15, IL-2, a cadeia α do receptor de alta afinidade para a IL-2 (IL-2R α) e o fator de crescimento de macrófagos/granulócitos (GM-CSF) (AZRAN; SCHAVINSKY-KHRAPUNSKY; ABOUD, 2004). IL-2, uma citocina essencial na proliferação celular é secretada por linfócitos T ativados e atua de forma autócrina e parácrina estimulando a proliferação clonal de linfócitos T. Tax pode estimular igualmente a mitose ativando as ciclinas D (CDK4 e CDK6), inibindo proteínas regulatórias do ciclo celular (p15, p16, p53, pRb), ou a transcrição do gene que codifica a polimerase β , enzima envolvida no reparo do DNA (AZRAN; SCHAVINSKY-KHRAPUNSKY; ABOUD, 2004; GRANT et al., 2002; SUZUKI; UCHIDA-TOITA; YOSHIDA, 1999).

Além disso, Tax aumenta a expressão de proto-oncogenes como c-Fos, c-Jun, (AZRAN; SCHAVINSKY-KHRAPUNSKY; ABOUD, 2004), e inibe a expressão de genes envolvidos no reparo do DNA (BRAUWEILER et al., 1997). Por outro lado, é descrita uma

resistência à apoptose das células infectadas pelo HTLV. Esta resistência pode ser explicada pela ação de Tax sobre os fatores de transcrição nuclear como CREB/ATF, NF- κ B (TREVISAN et al., 2006) e ao aumento da expressão de Bcl-2 (NAKASHIMA et al., 2003), que previnem as células a entrar em apoptose. Mais recentemente, demonstrou-se que Tax induz a amplificação do centrossomo celular gerando anormalidades cromossômicas (CHING et al., 2004), e diminui a atividade da telomerase (GABET et al., 2003). Esse conjunto de alterações leva a uma instabilidade genética na célula infectada, favorecendo o aparecimento de neoplasias (SIBON et al., 2006).

2.9 Tratamento

Os critérios de tratamento para a infecção pelo HTLV-1 são variáveis. Os casos assintomáticos não devem ser tratados, considerando a baixa probabilidade para o desenvolvimento de doença. Assim, apenas os pacientes com diagnóstico de entidades clínicas relacionadas à infecção devem ser tratados. No entanto, ainda não existe um tratamento comprovadamente efetivo.

Para o tratamento de HAM/TSP, diferentes regimes terapêuticos têm sido propostos. Corticosteróides como prednisona têm sido utilizados, entretanto a melhora clínica com a corticoterapia é observada apenas na fase inflamatória da HAM/TSP e os efeitos não são duradouros (OSAME, 1990; YAMASAKI et al., 1997). Altas doses de gamaglobulina têm sido utilizadas em pequenas séries de pacientes. Kuroda e colaboradores (1991) observaram uma melhora em 10 pacientes dos 14 submetidos a este tratamento, entretanto houve uma progressão da doença após o término do tratamento (KURODA et al., 1991). O uso de vitamina C em altas doses mostrou efeito benéfico, entretanto o estudo envolveu apenas sete pacientes com HAM/TSP (KATAOKA et al., 1993). A pentoxifilina, um inibidor não específico de fosfatidilserases, foi testada em 15 pacientes, melhorando a capacidade motora de treze pacientes tratados. No entanto, este estudo foi conduzido apenas por quatro semanas (SHIRABE et al., 1997). A lamivudina, um inibidor da transcriptase reversa análogo nucleosídeo, mostrou uma redução temporária na carga proviral em cinco pacientes com HAM/TSP (TAYLOR et al., 1999). A combinação de dois inibidores de transcriptase reversa, a zidovudina (AZT) com a lamivudina, em um estudo de caso controle no qual

acompanhou por seis meses dezesseis pacientes com HAM/TSP não demonstrou benefício (TAYLOR et al., 2006).

A utilização de citocinas recombinantes com propriedades antivirais como os interferons do tipo I (IFN- α e β), tem sido uma alternativa para o tratamento de HAM/TSP. A terapia com IFN- α em pacientes com HAM/TSP diminuiu a carga proviral e a proporção de linfócitos T CD8⁺ de memória. Por outro lado, o aumento da proporção de linfócitos T CD8⁺ efetores foi inversamente proporcional à carga proviral (SAITO et al., 2004). O tratamento com IFN- β 1a, citocina produzida principalmente por fibroblastos, reduziu a expressão de RNAm para Tax e a frequência de células T CD8⁺ em doze pacientes tratados. Não houve alteração na carga proviral desses pacientes, entretanto a espasticidade muscular diminuiu, algumas funções motoras melhoraram e não houve progressão dos sintomas durante o tratamento (OH et al., 2005).

O tratamento da ATLL com quimioterapia convencional tem benefícios limitados, com pequena resposta terapêutica. Outra complicação para o tratamento são as infecções secundárias decorrentes de uma imunodeficiência, traduzida por infecção fúngicas na pele, pneumonia por *Pneumocistis jirovecii*, herpes zoster, meningite criptocócica, strongiloidiase disseminada, entre outras enfermidades (MARSH, 1996).

As células infectadas pelo HTLV-1 são resistentes a diversas drogas indutoras de apoptose. A combinação de AZT e IFN- α é parcialmente eficaz *in vivo*, porém com alta toxicidade para as células (HERMINE et al., 1995). Um estudo prospectivo de fase II com 19 pacientes com ATLL tratados com AZT e IFN- α demonstrou uma melhora parcial e um prolongamento da sobrevida desses pacientes (HERMINE et al., 2002). Uma segunda combinação trióxido arsênico com o IFN- α tem sido estudada. Em estudos de fase II, esta combinação foi capaz de bloquear o ciclo celular e induzir a apoptose em células infectadas pelo HTLV-1 e em células malignas de ATLL (HERMINE et al., 2004). Um estudo realizado no Japão com 96 pacientes com ATLL que receberam tratamento de indução intensivo associado ao GM-CSF (filgrastina) não mostrou benefícios além de uma sobrevida média de 13 meses. (BAZARBACHI et al., 2004).

Watanabe e colaboradores (2005) demonstraram que um inibidor de NF- κ B (DHMEQ) foi capaz de induzir seletivamente a apoptose em células infectadas pelo HTLV-1. O mesmo pode ser observado em células de ATLL tratadas com o anti-retroviral inibidor de protease Ritonavir (DEWAN et al., 2006). Bloqueando a ativação de NF κ B em células ATLL (CHE et al., 2006; HORIE; WATANABE; UMEZAWA, 2006) e a atividade do transdutor de sinal (Janus Kinase –JAK) em células de linhagem infectadas pelo HTLV-1, foi também possível induzir a apoptose (TOMITA et al., 2006). A tentativa de encontrar substâncias indutoras da apoptose em células infectadas pelo HTLV-1 pode contribuir para o desenvolvimento de novas drogas .

Novos agentes citotóxicos como, análogos de nucleosídeos pentostatina, inibidores de topoisomerasas I e II têm sido testados em estudos pilotos de fase II em pacientes refratários, no entanto os resultados até o momento não são significantes. (BAZARBACHI et al., 2004).

2.9.1 Compostos quinolínicos

O tratamento atual das doenças associadas ao HTLV-1, como descrito acima é oneroso, tóxico e pouco eficaz. Desta forma, justifica-se a necessidade de desenvolver novas drogas para o tratamento da infecção pelo HTLV-1.

Recentemente, uma série de compostos quinolínicos foram descritos como capazes de diminuir a proliferação espontânea em linhagens celulares transformadas pelo HTLV-1 (FOURNET et al., 2003) Estes compostos são alcalóides isolados da *Galipea longiflora* uma planta boliviana com propriedades medicinais (FOURNET et al., 1993). A atenção por esta planta ocorreu a partir da observação de seu uso entre os índios Chimane, moradores da Amazônia boliviana. Estes índios utilizavam extratos desta planta para cicatrizar as lesões cutâneas de leishmanioses. Posteriormente, o princípio ativo foi purificado servindo de base para a geração de diversos compostos ativos, como descrito abaixo. Atualmente os compostos quinolínicos extraídos desta planta foram modificados e são produzidos sinteticamente (FAKHFAKH et al., 2003).

Os compostos quinolínicos têm demonstrado eficácia no tratamento de leishmaniose cutânea experimental, principalmente contra espécies de leishmanias da América do Sul (FOURNET et al., 1993; FOURNET et al., 1996), além de atividade contra cepas responsáveis pela leishmaniose visceral (FOURNET et al., 1994; NAKAYAMA et al., 2005). Além disso, camundongos infectados com os parasitas *Plasmodium vinckei petteri* (GANTIER et al., 1996) e *Trypanosoma cruzi* (NAKAYAMA et al., 2001) tratados oralmente com compostos quinolínicos apresentaram uma diminuição da carga parasitária semelhante ao tratamento convencional com benznidazol e cloroquina, respectivamente, com menor efeito tóxico que estas drogas.

Além da atividade antiprotozoários, estudos demonstraram que estes compostos quinolínicos apresentam igualmente atividade anti-retroviral. São potentes inibidores da enzima integrase do HIV-1 (MEKOUAR et al., 1998; ZOUHIRI et al., 2000) e como descrito acima, foram capazes de inibir a proliferação de células infectadas pelo HTLV-1. Fakhfakh e colaboradores (2003) demonstraram a eficácia de um composto quinolínico contra a *Leshmania* e o HIV, sugerindo a utilização deste como terapia em casos de coinfeção *Leshmania*-HIV.

Em nosso trabalho, estudamos a ação de 22 compostos quinolínicos sintéticos na inibição da proliferação espontânea em células de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Avaliamos também o perfil de citocinas, a carga proviral e a indução da apoptose em células de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em presença dos compostos que inibiram a proliferação espontânea. Desta forma esperamos contribuir para o estudo de novos fármacos eficazes para o tratamento de doenças associadas ao HTLV-1.

3. JUSTIFICATIVA

No Brasil, a prevalência de HTLV-1 é particularmente elevada em Salvador-Bahia, onde cerca de 2% da população de Salvador encontra-se infectada. Uma das características mais marcantes da infecção pelo HTLV-1 é a presença de uma linfoproliferação espontânea dos linfócitos T, observada em cerca de 50% dos indivíduos infectados. O papel deste fenômeno na patogênese da infecção não está esclarecido, mas existem indícios de maiores níveis de proliferação em indivíduos com diagnóstico de HAM/TSP. Entretanto, este fenômeno tem sido descrito igualmente em indivíduos infectados assintomáticos. A ATLL, uma doença linfoproliferativa maligna de elevada mortalidade causada pelo HTLV-1, tem sido descrita em 30% dos indivíduos com malignidades de células T em nosso meio. A progressão para a doença não está associada à magnitude da carga proviral, entretanto, tem sido demonstrado que a carga proviral é maior nos indivíduos com as diversas enfermidades clínicas associadas ao vírus. As células infectadas pelo HTLV-1 são resistentes a drogas indutoras de apoptose. Esta é mais uma característica da infecção que dificulta o tratamento das patologias associadas, principalmente a ATLL. A identificação de novos compostos com atividade inibitória da proliferação celular, capazes de diminuir a carga proviral e induzir a apoptose pode contribuir para o tratamento das patologias e da própria infecção pelo HTLV-1.

4. OBJETIVOS

3.1 Geral:

- ❖ Avaliar a modulação da proliferação celular espontânea de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV em presença de 22 compostos quinolínicos sintéticos.

3.2 Específicos:

- ❖ Avaliar a toxicidade dos compostos quinolínicos estudados em PBMC de indivíduos não infectados e infectados pelo HTLV-1;
- ❖ Determinar a capacidade destes compostos quinolínicos em inibir a proliferação espontânea *in vitro* de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1;
- ❖ Quantificar a proporção de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IL-10, TNF- α e IFN- γ de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em presença dos compostos quinolínicos inibidores da proliferação espontânea;
- ❖ Quantificar a carga proviral em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em presença dos compostos quinolínicos inibidores da proliferação espontânea;
- ❖ Verificar se há aumento de apoptose de PBMC, de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em presença dos compostos quinolínicos estudados com atividade inibidora da proliferação demonstrada.

5. PACIENTES E MÉTODOS

5.1 Pacientes

Foram envolvidos no estudo indivíduos infectados pelo HTLV-1, assintomáticos provenientes do Centro de Referência de HTLV da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências (FBDC/FIOCRUZ). Os controles não infectados foram voluntários selecionados entre a equipe da Fiocruz. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos participantes do estudo.

5.2 Células

Foram coletados 20 ml de sangue por punção venosa em tubos contendo heparina. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram obtidas por centrifugação em gradiente de Ficoll. Para a obtenção de linfoblastos, PBMC (1×10^6 /ml) de doadores não infectados pelo HTLV foram cultivados em presença de 2 μ g/ml de fitohemaglutinina (PHA) em meio RPMI 1640, suplementado com 2 mM glutamina (Sigma), 100 μ g/ml penicilina (Sigma), 100 μ g/ml estreptomicina (Sigma) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Hyclone, Logan Utah) em garrafas de cultura (Falcon) a 37°C e com 5% de CO₂. As células foram alimentadas e suplementadas com 2 unidades/ml de IL-2 a cada três dias.

5.3 Compostos quinolínicos

Os compostos quinolínicos utilizados foram obtidos através de uma colaboração com o Dr. Alain Fournet, da Faculdade de Química da Universidade de Paris-Sul e do Institut de Recherche pour le Développement (IDR) Paris - França. Vinte e dois compostos foram avaliados: **BS34, BS37, BS68, BS71, BS74, MDS14, MDS22, MDS27, MHM8, MHM16, MHM22, SF27, SF47, SF103, SF104, XF719, XF731, XF737, XF745, XF753, XF755, XF907**. Os compostos foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma) a uma concentração de 10⁵ μ M e esterilizados por irradiação γ (250 rad/seg, 15000 seg). Em seguida, foram aliquotados em recipientes (50 μ l por tubo) e estocados a -20°C. No

momento do uso, os compostos foram diluídos em meio de cultura suplementado e ajustados para as concentrações estudadas.

5.4 Avaliação da viabilidade celular

Os testes de toxicidade celular foram realizados utilizando linfoblastos (10^5 células/ml) de três doadores não infectados pelo HTLV. As células foram cultivadas em presença de 10, 50 e 100 μM de cada um dos compostos em triplicata, em placas de 96 poços fundo U (COSTAR) a 37°C com 5% de CO_2 . Após três dias de cultura, a viabilidade celular foi avaliada por Azul de Trypan, utilizando um microscópio óptico (Nikon-Model Labophot-2, Japan) e pelo método colorimétrico XTT, registrado pela densidade óptica (DO) por um espectrofotômetro com filtro de 450 nm. A média das triplicatas foi determinada. A porcentagem de células viáveis foi calculada através da razão entre a média da DO de células em presença dos compostos quinolínicos e da concentração correspondente de DMSO. Consideramos um composto quinolínico tóxico quando a viabilidade celular foi inferior a 85%. Este valor arbitrário foi estipulado a partir da viabilidade celular média dos linfoblastos cultivados por três dias em presença apenas de meio de cultura, o qual foi de $96 \pm 4\%$. A toxicidade dos compostos quinolínicos em células de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foi igualmente avaliada.

5.5 Linfoproliferação

Os ensaios de linfoproliferação foram realizados com PBMC total de indivíduos infectados pelo HTLV-1 cultivados em presença de diluições seriadas de compostos quinolínicos (100 a 0,8 μM). Após 5 dias de cultura, as células foram pulsadas por 16 h com 1 μCi ^3H -timidina (ICN, Costa Mesa, CA). A ^3H -timidina incorporada foi mensurada utilizando contador de radioatividade beta-counter (Direct Beta Counter, Matrix 9600 - Packard). Os resultados foram apresentados em contagens por minuto (cpm). O índice de estimulação da proliferação foi calculado conforme mostra a fórmula abaixo:

$$\text{IE} = \frac{\text{média cpm } [^3\text{H}]\text{-timidina incorporada com composto quinolínico}}{\text{média cpm } [^3\text{H}]\text{-timidina incorporada sem composto quinolínico}}$$

5.6 Detecção intracelular de citocinas

Para avaliar a produção de citocinas, 1×10^6 PBMC foram cultivados em presença dos compostos quinolínicos em concentrações que inibiram o máximo da proliferação espontânea, por 20 horas, em placas de 24 poços. Durante as últimas 4 horas, foram adicionados 10 $\mu\text{g/ml}$ de Brefaldina-A e de Monensina. Após lavagem, as células foram incubadas com anticorpos mononucleares anti-CD4-FITC e anti-CD8-Tri-color por 20 minutos, e em seguida eram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% por 20 minutos e permeabilizadas com solução de Saponina a 0,1% por 30 minutos a 4°C. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos em presença de um dos seguintes anticorpos: anti-IFN- γ , anti-TNF- α , anti-IL-10, ou controles isotípicos conjugados com ficoeritrina-PE. Os dados foram adquiridos através de FACscan e analisadas através do software Cellquest.

5.7 Detecção de carga proviral

As células (1×10^6 PBMC) de indivíduos infectados foram cultivados em presença dos compostos quinolínicos por três dias, em concentrações que inibiram o máximo da proliferação espontânea. A carga proviral do HTLV-1 foi mensurada utilizando PCR em tempo real através do sistema TaqMan™ da Applied Biosystems do Brasil, como descrito em Dehee et al (2002). Em resumo, foram utilizados os primers SK110/SK111 para amplificar um fragmento de 186 pb da região pol e a sonda TaqMan (5'FAM and 3' TAMRA) para a seqüência de referência do HTLV-1 (HTLVATK), localizada no fragmento 4829-4858 pb. O DNA do gene da albumina foi quantificado em paralelo como controle interno. O DNA das amostras foi extraído utilizando uma coluna de extração (QUIAGEN). A quantificação do DNA de HTLV-1 foi realizada. A quantidade de provírus foi calculada pelo seguinte formula:

$$\text{CPV} = \frac{\text{número de cópias do HTLV-1 (gene pol)}}{\text{número de cópias de albumina/2}} \times 10^6$$

5.8 Quantificação da apoptose

Para quantificar a apoptose, 1×10^6 PBMC foram cultivados em presença dos compostos quinolínicos em concentrações que inibiram o máximo da proliferação espontânea por três e cinco dias. As células foram incubadas com 2 μ l de iodeto de propídeo (Pi) e 4 μ l de anexina V-FITC por 10 minutos. Os dados foram adquiridos pelo FACscan e analisadas através do software Cellquest. A proporção de células em apoptose foi determinada pela porcentagem de expressão de anexina, após exclusão das células Pi⁺.

5.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão. A correlação entre viabilidade celular medida pelo método do Azul de Trypan e pelo método XTT foi realizada através da correlação de Spearman (Grafpad Prism Version 3.0). Para a análise dos dados de amostras relacionadas, utilizamos o teste de Wilcoxon e para as amostras independentes, o Mann-Whitney, ambos pelo programa BioEstat3. As diferenças foram consideradas como estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação da toxicidade celular dos compostos quinolínicos

Como podemos observar na **Tabela 1**, dos 22 compostos quinolínicos estudados, quinze não apresentaram toxicidade nas concentrações testadas: **BS34, BS68, BS71, MDS14, MDS22, MHM8, MHM16, MHM22, SF27, SF47, SF103, SF104, XF731, XF753 e XF755**. Os compostos **MDS27 e XF745** foram tóxicos nas três concentrações testadas. Os demais apresentaram toxicidade em uma ou duas concentrações estudadas. Quando avaliamos a correlação entre a viabilidade celular obtida pelos métodos Azul de Trypan e XTT, observamos uma correlação significativa entre ambos os métodos para todas as concentrações testadas (para 100 μM , $R= 0,74$ e $p= 0,0001$, 50 μM $R= 0,75$ e $p = 0,0001$ e 10 μM $R= 0,61$ e $p= 0,0026$).

Tabela 1. Viabilidade celular de linfoblastos cultivados em presença de compostos quinolínicos.

Composto	Concentração (μM)					
	100		50		10	
	Azul Trypan	XTT	Azul Trypan	XTT	Azul Trypan	XTT
BS 34	91	86	92	92	93	93
BS 37	52	82	79	91	89	100
BS 68	95	92	91	95	93	100
BS 71	94	88	94	100	94	100
BS 74	72	74	85	95	87	91
MDS 14	96	100	93	100	96	100
MDS 27	44	48	43	52	73	72
MDS 22	94	95	95	100	96	100
MHM 8	85	100	92	100	95	100
MHM 16	96	100	95	100	94	100
MHM 22	92	100	92	100	95	90
SF 27	91	96	95	96	95	100
SF 47	94	91	96	96	97	100
SF 103	93	100	95	100	96	100
SF 104	92	87	97	100	96	100
XF 719	64	70	79	96	93	100
XF 731	92	95	88	97	90	100
XF 737	56	51	67	68	88	89
XF 745	53	50	62	51	75	83
XF 753	94	100	93	100	95	97
XF 755	94	100	93	100	97	100
XF 907	72	74	86	79	93	93

Os dados correspondem a porcentagem média da viabilidade celular de linfoblastos de três doadores não infectados pelo HTLV-1, cultivados por 72 horas em presença de 100, 50 e 10 μM dos compostos quinolínicos. A viabilidade celular média dos linfoblastos cultivados por três dias em presença apenas de meio de cultura foi de $96 \pm 4\%$. Os composto foram considerados tóxicos quando a viabilidade celular em presença dos compostos foi inferior a 85%.

6.2 Avaliação da atividade inibitória dos compostos quinolônicos na linfoproliferação de indivíduos infectados pelo HTLV-1

Inicialmente determinamos a cinética de proliferação espontânea de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Consideramos como proliferação espontânea uma média de proliferação \geq a 500 cpm em PBMC cultivados na ausência de estímulo antigênico. Este valor arbitrário corresponde a cerca de três vezes o valor da cpm média de PBMC não estimuladas de controles não infectados (107 ± 97) (Mascarenhas 2006). Como podemos observar na **Figura 6**, PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV atingem um pico de proliferação celular entre o 4^o e o 5^o dia de cultura. A média de proliferação no primeiro dia de cultura foi de 65 ± 90 cpm, após dois dias foi 721 ± 1.021 cpm, após três dias foi 1.309 ± 1.012 cpm, após 4 dias foi 3.704 ± 2.810 cpm e de 4.582 ± 3.144 cpm após 5 dias de cultura.

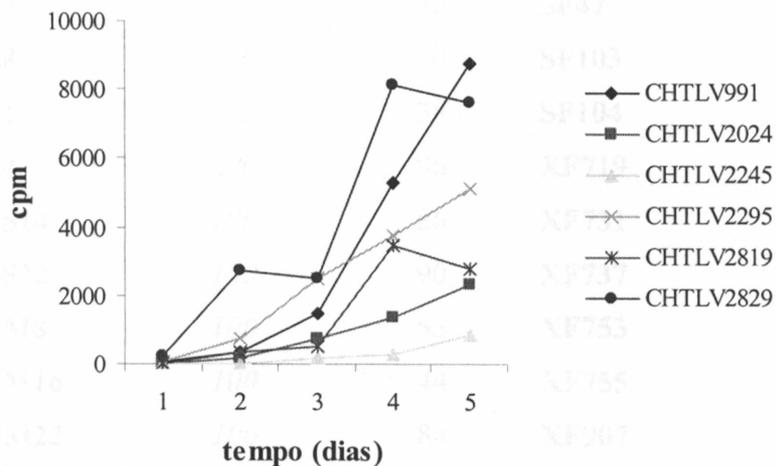


Figura 6. Cinética da proliferação espontânea em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV. PBMC ($10^5/\text{ml}$) de seis pacientes foram cultivados na ausência de estímulos exógenos por um período de um a cinco dias. A proliferação foi medida pela incorporação de ^3H -timidina nas últimas 16 horas de cultura. (cpm = contagens por minuto).

Os compostos quinolínicos foram avaliados quanto à capacidade de inibir a linfoproliferação espontânea em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Na **Tabela 2** podem ser observados os percentuais máximos de inibição da proliferação espontânea com as menores concentrações de cada um dos compostos testados. Os compostos apresentaram atividade inibitória variável ou não tiveram ação sobre a proliferação espontânea (**XF737** e **XF755**). Nove compostos apresentaram uma capacidade de inibição superior a 50%. Destes, quatro inibiram a proliferação espontânea em mais de 80% (**BS74**, **MDS14**, **MDS22** e **MHM22**).

Tabela 2. Atividade antiproliferativa dos compostos quinolínicos em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1

Composto	Concentração (μM)	Inibição (%)	Composto	Concentração (μM)	Inibição (%)
BS34	50	56	SF27	100	38
BS37	12,5	46	SF47	100	52
BS68	100	10	SF103	50	43
BS71	100	38	SF104	100	30
BS74	25	96	XF719	50	3
MDS14	100	86	XF731	100	71
MDS22	100	90	XF737	10	0
MHM8	100	53	XF753	100	10
MHM16	100	44	XF755	100	0
MHM22	100	84	XF907	25	71

Os dados representam a porcentagem média dos valores máximos da inibição da proliferação espontânea e a respectiva concentração de composto quinolínico utilizada. PBMC de três indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram cultivados.

Como observamos na **Figura 7**, a curva concentração resposta dos quatro compostos com capacidade de inibição da proliferação espontânea superior a 80%, apenas **BS74** e **MHM22** apresentaram curva concentração-resposta padrão, enquanto **MDS14** e

MDS22 mostram uma inibição moderada a 0,8 μM (40 e 58% de inibição, respectivamente).

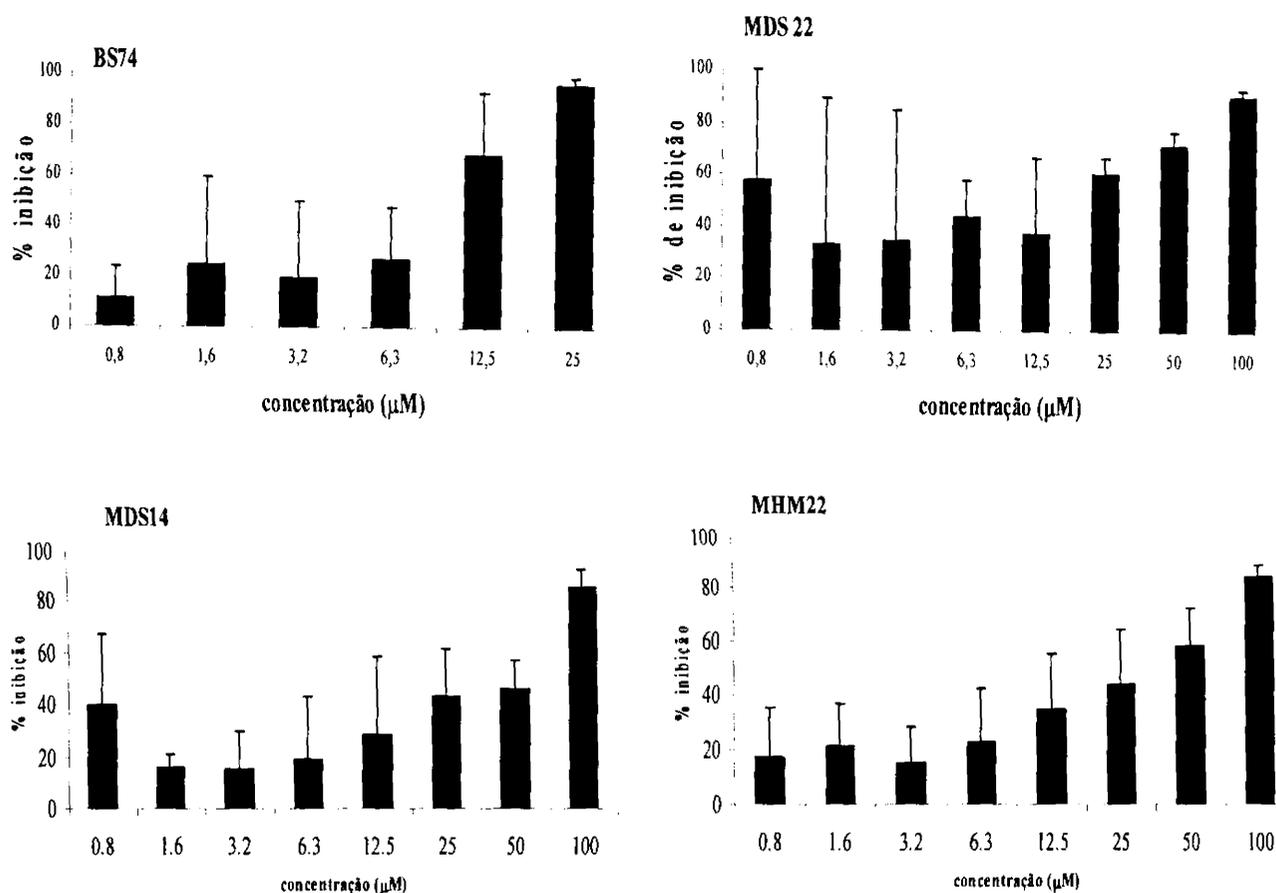


Figura 7 Curva dose-resposta da inibição da proliferação espontânea em presença dos compostos quinolônicos. As barras representam, a média + SD da inibição da linfoproliferação em PBMC de três indivíduos infectados pelo HTLV-1 distintos.

Para afastar a possibilidade de que o efeito inibitório sobre a proliferação tenha sido decorrente de uma toxicidade dos compostos quinolônicos sobre PBMC de indivíduos infectados, avaliamos a viabilidade celular em presença de cada um dos compostos. Após cinco dias de cultura, a viabilidade celular foi de 88% em presença de **BS74** e 91% em presença dos compostos **MDS14**, **MDS22** e **MHM22**.

6.3 Avaliação do perfil de citocinas em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em presença dos compostos quinolínicos inibidores da proliferação espontânea.

Em seguida, avaliamos o perfil de produção de citocinas do tipo Th1 (TNF- α e IFN- γ) e Th2 (IL-10) de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, na presença dos quatro compostos quinolínicos que inibiram mais de 80% da proliferação espontânea (**BS74**, **MDS14**, **MDS22** e **MHM22**). Como observado na **Tabela 3**, não houve diferença entre a proporção de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ e TNF- α , na presença ou ausência dos compostos. Entretanto, quando PBMC eram cultivados na presença de **MDS14**, observamos um aumento na proporção de células T CD4⁺ produtoras de IL-10 ($2,4 \pm 1,6\%$), comparada ao controle ($1,1 \pm 1,5$) ($p= 0,05$). O mesmo foi observado para a subpopulação T CD8⁺ IL-10⁺ ($3,4 \pm 2,7\%$), comparada ao controle ($0,7 \pm 0,6\%$) ($p= 0,04$).

Tabela 3. Proporção de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores de IFN- γ , TNF- α e IL-10 em presença dos compostos quinolínicos

Composto	Concen- tração	Linfócitos T CD4 ⁺			Linfócitos T CD8 ⁺		
		IFN- γ	TNF- α	IL-10	IFN- γ	TNF- α	IL-10
BS74	<i>controle</i>	2,3 \pm 2,9	1,4 \pm 1,9	0,7 \pm 1,1	3,4 \pm 3,1	1,6 \pm 2,4	3,1 \pm 3,6
	25 μ M	1,9 \pm 3,1	1,9 \pm 2,4	0,6 \pm 0,7	2,7 \pm 3,1	2,9 \pm 3,5	1,4 \pm 1,0
MDS14	<i>controle</i>	1,6 \pm 2,2	1,0 \pm 1,0	1,1 \pm 1,5	2,8 \pm 2,1	0,6 \pm 1,1	0,7 \pm 0,6
	100 μ M	2,0 \pm 2,4	1,1 \pm 0,7	2,4 \pm 1,6*	7,4 \pm 5,3	1,4 \pm 1,9	3,4 \pm 2,7*
MDS22	<i>controle</i>	0,4 \pm 0,8	0,7 \pm 0,8	0,3 \pm 0,4	1,8 \pm 1,7	0,8 \pm 0,9	1,8 \pm 2,8
	100 μ M	0,14 \pm 0,2	0,7 \pm 0,9	0,8 \pm 1,1	2,3 \pm 2,9	1,9 \pm 3,3	3,1 \pm 3,0
MHM22	<i>controle</i>	2,6 \pm 3,9	0,5 \pm 0,7	3,6 \pm 8,5	4,5 \pm 3,5	1,1 \pm 1,2	2,9 \pm 4,6
	100 μ M	6,5 \pm 9,7	3,4 \pm 4,6	7,6 \pm 12,2	15,4 \pm 28	5,9 \pm 9,9	5,7 \pm 5,8

Os dados representam a porcentagem média \pm SD de células produtoras das citocinas. PBMC de seis indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram cultivados por 20 horas na presença de 25 μ M de BS74 e 100 μ M de MDS14, MDS22 e MHM22. Detecção intracelular de citocinas avaliada por citometria de fluxo (* p = 0.05).

6.4 Avaliação da carga proviral em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em presença dos compostos quinolínicos inibidores da proliferação espontânea.

Em relação ao efeito dos compostos quinolínicos sobre a carga proviral, apenas o composto **MHM22** foi capaz de diminuir a carga proviral. A média da carga proviral foi 42.174 ± 32.030 cópias de HTLV-1 em 1×10^6 PBMC (variando de 797 a 95.029), nos seis indivíduos avaliados. Na presença do composto **MHM22**, houve uma diminuição de cerca de 40% ($24.924 \pm 16,739$) ($p= 0,027$) (**Figura 8**).

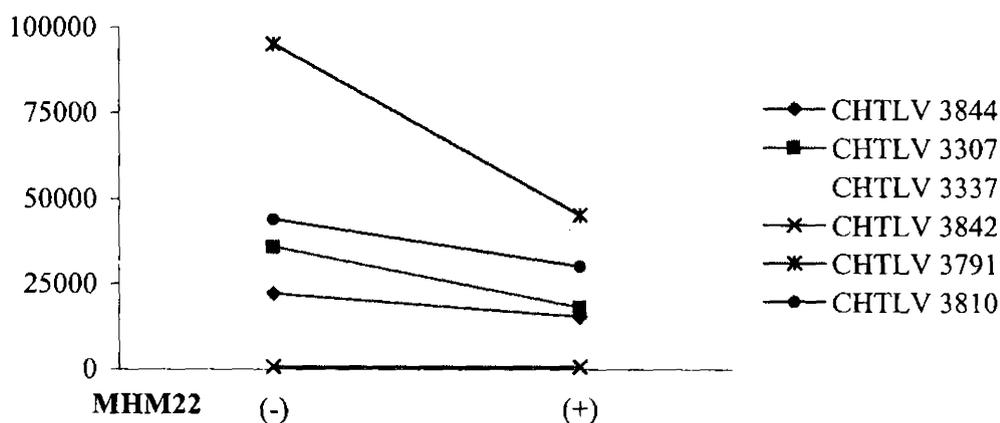


Figura 8. PBMC de seis indivíduos cultivados pelo HTLV-1 foram cultivados com o composto **MHM22** por três dias. A avaliação da carga proviral foi feita por Real Time PCR (-) controle, (+) presença de **MHM22**.

6.5 Avaliação da indução da apoptose em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em presença dos compostos quinolínicos inibidores da proliferação espontânea.

A proporção de células em apoptose de PBMC de indivíduos não infectados pelo HTLV, na presença de **BS74** foi de $6,8 \pm 1,4\%$. Entretanto, em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV esta proporção foi significativamente maior ($22 \pm 12\%$) ($p= 0,01$). A proporção de PBMC de indivíduos infectados ou não pelo HTLV em apoptose em presença de **MDS22** e **MHM22** foi semelhante à dos controles (**Figura 9**).

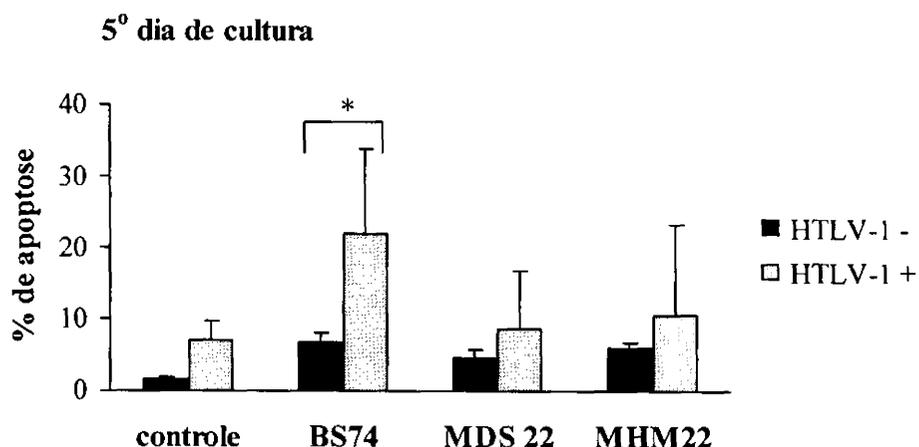


Figura 9. Os valores apresentados referem-se à proporção média (\pm SD) de apoptose na presença dos compostos quinolínicos. As barras cinzas representam a porcentagem média de apoptose em PBMC de seis indivíduos não infectados pelo HTLV-1 e as barras pretas representam a porcentagem média de apoptose em PBMC de seis indivíduos infectados pelo HTLV-1. * $p= 0,01$ Teste Mann-Whitney.

O composto **MDS14** não pode ser avaliado, pois emitia fluorescência no mesmo canal da marcação para anexina no citômetro de fluxo.

7. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos a capacidade de compostos quinolínicos de inibir a proliferação espontânea em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e os efeitos dos compostos mais ativos sobre a carga proviral, o perfil de citocinas e a indução da apoptose.

Avaliamos os quatro compostos que inibiram mais de 80% da proliferação espontânea nos três parâmetros propostos (citocinas, carga proviral, apoptose). No entanto, uma das limitações de nosso trabalho foi não avaliar todos os parâmetros estudados em PBMC de um mesmo indivíduo. De fato, o número de células necessárias para realizar todos os experimentos foi um fator limitante, porém essa limitação não nos impossibilita de fazermos inferências sobre os compostos, já que cada um apresentou apenas um efeito sobre os parâmetros avaliados. Em presença de **BS74** ocorreu um aumento do número de células em apoptose **MDS14** aumentou a proporção de linfócitos produtores de IL-10, **MHM22** diminuiu a carga proviral em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e o composto **MDS22** não apresentou nenhum efeito nestes parâmetros.

Nossos resultados identificaram quatro compostos ativos. O composto **BS74** apresentou o maior índice de inibição da linfoproliferação em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (96% a 25 μ M), mesmo nas concentrações de 50, 25 e 12,5 μ M foi capaz de inibir mais de 70% da proliferação espontânea. Os três outros compostos ativos apresentaram, nas maiores concentrações testadas, uma média de inibição de 85%.

Os compostos quinolínicos têm demonstrado eficácia para o tratamento de leishmaniose visceral e cutânea em camundongos em diferentes formas de administração: oral, peritoneal e subcutânea (FOURNET et al., 1996). Têm demonstrado igualmente uma atividade *in vitro* em linhagens celulares infectadas com HIV e HTLV-1. Alguns compostos quinolínicos são potentes inibidores da integrase do HIV-1 (MEKOUAR et al., 1998), estes compostos apresentam similaridades com os nossos compostos **XF907** e **XF731**, entretanto desconhecemos a ação destes sobre as enzimas do HTLV.

Um estudo prévio avaliou 29 compostos quinolínicos em células de linhagem infectadas pelo HTLV-1 (FOURNET et al., 2003). Quando comparamos os mesmos

compostos quinolínicos utilizados no estudo de Fournet e colaboradores (2003) com nosso estudo observamos os seguintes resultados. Os compostos **BS74** e **MHM22** inibiram mais de 85% da proliferação de células de linhagem HUT-102 a 10 μM . Em nosso estudo para inibir índices similares utilizamos concentrações maiores, 25 e 100 μM respectivamente. Os compostos **SF103** e **MHM8** que apresentaram índices de inibição baixo a moderado em células de linhagem HUT-102 (34 e 16% a 10 μM respectivamente) também apresentaram efeito moderado sobre a proliferação em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1, entretanto em concentrações mais elevadas (43% a 50 μM e 53% a 100 μM , respectivamente). Dois compostos **XF719** e **XF745** que não apresentaram atividade inibitória em células HUT-102 demonstraram um pequeno efeito inibitório (**XF719**) ou toxicidade (**XF745**) em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1. A concentração dos compostos quinolínicos utilizada para diminuir a proliferação de células de linhagem infectadas pelo HTLV-1 foi inferior à necessária para diminuir a proliferação espontânea em PBMC de indivíduos infectados. Esta diferença pode ser explicada por características proliferativas dos dois tipos celulares. A proliferação de células de linhagem consiste em uma expansão monoclonal, enquanto a proliferação espontânea de PBMC de indivíduos infectados é policlonal (MASCARENHAS et al., 2006; PRINCE et al., 1991). Modificações estruturais nestes compostos poderão ser feitas, no sentido de obter compostos com menor toxicidade celular para que concentrações mais elevadas possam ser usadas.

Quanto aos prováveis efeitos dos compostos sobre as citocinas secretadas, observamos que não houve modificação no perfil das citocinas do tipo Th1 (INF- γ e TNF- α). Os níveis das citocinas pró-inflamatórias são elevadas em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Nos indivíduos assintomáticos as T CD4⁺ são importantes produtoras de INF- γ (CARVALHO et al., 2001). A produção de citocinas ainda é mais elevada em pacientes com HAM/TSP e neste caso são as T CD8⁺ que produzem mais INF- γ e TNF- α do que as células T CD4⁺ (SANTOS et al., 2004, MUNIZ et al., 2006). Em nosso trabalho observamos que as células T CD8⁺ produzem mais citocinas, entretanto, em pacientes assintomáticos. O composto **MDS14** foi capaz de alterar o perfil Th2 em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Em presença do composto, a proporção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras de IL-10 aumentou significativamente. Bloqueando moléculas

coestimulatórias com anticorpos anti-CD80/CD86 de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e 2, ocorre um aumento na produção de IL-10 com concomitante inibição da proliferação espontânea (DEZZUTTI et al., 1998; LAL; RUDOLPH, 1991). Segundo Carvalho e colaboradores (2001), a IL-10 é capaz de diminuir a produção de IFN- γ em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Recentemente foi demonstrado que a produção de IL-10 por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ é um possível mecanismo imunoregulatório que contrabalance a produção de TNF- α , garantindo um status assintomático durante a infecção pelo HTLV-1 (BRITO-MELO et al., 2007). Nossos resultados sugerem que a inibição da proliferação espontânea pelo composto **MDS14** seja devido ao aumento na produção de IL-10.

A proliferação espontânea na infecção pelo HTLV é dependente de IL-2 e da maior expressão do receptor de alta afinidade de IL-2. Recentemente, o mesmo fenômeno foi observado para IL-15 e seu receptor. Experimentos utilizando anticorpos anti IL-15 ou contra seu receptor inibiram a proliferação espontânea em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (AZIMI et al., 1999). O uso de anticorpos monoclonais marcados radiotivamente ou não com alvo no receptor de IL-2 poderia trazer resultados promissores no tratamento de doenças associadas ao HTLV-1. No entanto em nossos estudos não foi possível detectar IL-2 através da citometria de fluxo.

Quando avaliamos o efeito dos compostos sobre a carga proviral observamos que o composto **MHM22** foi capaz de diminuir a carga proviral em todos os pacientes avaliados. Um composto quinolínico (fluoroquinolone **K-37**) foi capaz de inibir a replicação do HTLV-1 em células de linhagem MT-2 e MT-4, em PBMC de dois indivíduos com HAM/TSP, **K-37** reduziu os níveis do antígeno p19, sendo este resultado atribuído a uma inibição da expressão de Tax (WANG et al., 2002). Os demais compostos avaliados em nosso estudo não apresentaram efeitos sobre a carga proviral. Tal fato pode ter ocorrido por uma ação direta destes composto sobre a expressão do gene de Tax. Avaliando a produção do RNAm de Tax poderíamos tentar responder essas diferenças.

As células infectadas pelo HTLV-1 especialmente as células T CD8⁺ estão protegidas dos processos apoptóticos que governam a infecção (SIBON et al., 2006). Tax

interage com diversas moléculas reguladoras da apoptose, sendo o mecanismo molecular mais evidente da ação de Tax sobre a apoptose a sua persistente ativação so NF- κ B o que gera uma expressão de fatores anti-apoptóticos. Compostos derivados de plantas, como os polifenóis do chá verde, são capazes de induzir a apoptose (LI et al., 2000). O composto **BS74** induziu *in vitro* a apoptose em células infectadas pelo HTLV-1, desta forma a diminuição da proliferação espontânea causada por este composto pode estar relacionada a uma diminuição do número de células através da apoptose.

Neste estudo demonstramos que os compostos quinolínicos estudados apresentaram atividades sobre as características imunológicas e moleculares mais marcantes da infecção pelo HTLV-1. Por outro lado, este estudo não nos permite inferir sobre os possíveis mecanismos de ação dos compostos quinolínicos. Acreditamos que a identificação de compostos quinolínicos capazes de modular um dos componentes da resposta imune e/ou carga proviral abre perspectivas para um estudo mais aprofundado sobre estes compostos, a exemplo de estudos em animais para determinar a farmacocinética e estudos moleculares para determinar os seus mecanismos de ação.

8. CONCLUSÕES

Quatro compostos quinolínicos testados **BS74**, **MDS14**, **MDS22** e **MHM22** são capazes de inibir a proliferação espontânea em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1, produzindo efeitos diversos: **MDS14** aumenta a proporção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras de IL-10, **MHM22** diminui a carga proviral do HTLV-1 e **BS74** aumenta a proporção de células em apoptose em PBMC de indivíduos infectados.

REFERÊNCIAS

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, v. 163, n. 7, p. 4064-4072, 1999.

AZRAN, I.; SCHAVINSKY-KHRAPUNSKY, Y.; ABOUD, M. Role of tax protein in human t-cell leukemia virus type-i leukemogenicity. Retrovirology, v. 1, n. 1, p. 20, 2004.

BANGHAM, C. R.; OSAME, M. Cellular immune response to htlv-1. Oncogene, v. 24, n. 39, p. 6035-6046, 2005.

BARBOSA, H. S.; BITTENCOURT, A. L.; BARRETO DE ARAUJO, I.; PEREIRA FILHO, C. S.; FURLAN, R.; PEDROSA, C.; LESSA, G.; HARRINGTON JR, W.; GALVAO CASTRO, B. Adult t-cell leukemia/lymphoma in northeastern brazil: A clinical, histopathologic, and molecular study. J Acquir Immune Defic Syndr, v. 21, n. 1, p. 65-71, 1999.

BARMAK, K.; HARHAJ, E. W.; WIGDAHL, B. Mediators of central nervous system damage during the progression of human t-cell leukemia type i-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J Neurovirol, v. 9, n. 5, p. 522-529, 2003.

BARMAK, K.; HARHAJ, E.; GRANT, C.; ALEFANTIS, T.; WIGDAHL, B. Human t cell leukemia virus type i-induced disease: Pathways to cancer and neurodegeneration. Virology, v. 308, n. 1, p. 1-12, 2003.

BAZARBACHI, A.; HERMINE, O. Treatment of adult t-cell leukaemia/lymphoma: Current strategy and future perspectives. Virus Res, v. 78, n. 1-2, p. 79-92, 2001.

BAZARBACHI, A.; GHEZ, D.; LEPELLETIER, Y.; NASR, R.; DE THE, H.; EL-SABBAN, M. E.; HERMINE, O. New therapeutic approaches for adult t-cell leukaemia. Lancet Oncol, v. 5, n. 11, p. 664-672, 2004.

BIDDISON, W. E.; KUBOTA, R.; KAWANISHI, T.; TAUB, D. D.; CRUIKSHANK, W. W.; CENTER, D. M.; CONNOR, E. W.; UTZ, U.; JACOBSON, S. Human t cell leukemia virus type i (htlv-i)-specific cd8+ ctl clones from patients with htlv-i-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. J Immunol, v. 159, n. 4, p. 2018-2025, 1997.

BITTENCOURT, A. L.; DOURADO, I.; FILHO, P. B.; 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, v. 26, n. 5, p. 490-494, 2001.

BLAS, M.; BRAVO, F.; CASTILLO, W.; CASTILLO, W. J.; BALLONA, R.; NAVARRO, P.; CATAFORA, J.; CAIRAMPOMA, R.; GOTUZZO, E. Norwegian scabies in peru: The impact of human t cell lymphotropic virus type i infection. Am J Trop Med Hyg, v. 72, n. 6, p. 855-857, 2005.

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, v. 231, n. 1, p. 135-140, 1997.

BRITES, C.; WEYLL, M.; PEDROSO, C.; BADARO, R. Severe and norwegian scabies are strongly associated with retroviral (hiv-1/htlv-1) infection in bahia, brazil. Aids, v. 16, n. 9, p. 1292-1293, 2002.

BRITO-MELO, G. E.; PERUHYPE-MAGALHAES, V.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARBOSA-STANCIOLI, E. F.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; CATALAN-SOARES, B.; RIBAS, J. G.; MARTINS-FILHO, O. A. Il-10 produced by cd4+ and cd8+ t cells emerge as a putative immunoregulatory mechanism to counterbalance the monocyte-derived tnf-alpha and guarantee asymptomatic clinical status during chronic htlv-i infection. Clin Exp Immunol, v. 147, n. 1, p. 35-44, 2007.

CALATTINI, S.; CHEVALIER, S. A.; DUPREZ, R.; BASSOT, S.; FROMENT, A.; MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. Discovery of a new human t-cell lymphotropic virus (htlv-3) in central africa. Retrovirology, v. 2, n. 1, p. 30, 2005.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; RIBAS, J. G.; CATALAN-SOARES, B. C.; MARTINS, M. L.; BRITO-MELO, G. E.; MARTINS-FILHO, O. A.; PINHEIRO, S. R.; ARAUJO ADE, Q.; GALVAO-CASTRO, B.; DE OLIVEIRA, M. S.; GUEDES, A. C.; PROIETTI, F. A. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop, v. 35, n. 5, p. 499-508, 2002.

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, v. 27, n. 1, p. 1-6, 2001.

CHE, X. F.; ZHENG, C. L.; OWATARI, S.; MUTOH, M.; GOTANDA, T.; JEUNG, H. C.; FURUKAWA, T.; IKEDA, R.; YAMAMOTO, M.; HARAGUCHI, M.; ARIMA, N.;

AKIYAMA, S. Overexpression of survivin in primary atl cells and sodium arsenite induces apoptosis by down-regulating survivin expression in atl cell lines. Blood, v. 107, n. 12, p. 4880-4887, 2006.

CHING, Y. P.; CHUN, A. C.; CHIN, K. T.; ZHANG, Z. Q.; JEANG, K. T.; JIN, D. Y. Specific tataa and bzip requirements suggest that htlv-i tax has transcriptional activity subsequent to the assembly of an initiation complex. Retrovirology, v. 1, n. 1, p. 18, 2004.

DEWAN, M. Z.; UCHIHARA, J. N.; TERASHIMA, K.; HONDA, M.; SATA, T.; ITO, M.; FUJII, N.; UOZUMI, K.; TSUKASAKI, K.; TOMONAGA, M.; KUBUKI, Y.; OKAYAMA, A.; TOI, M.; MORI, N.; YAMAMOTO, N. Efficient intervention of growth and infiltration of primary adult t-cell leukemia cells by an hiv protease inhibitor, ritonavir. Blood, v. 107, n. 2, p. 716-724, 2006.

DEZZUTTI, C. S.; SASSO, D. R.; RUDOLPH, D. L.; LAL, R. B. Down-regulation of interleukin-10 expression and production is associated with spontaneous proliferation by lymphocytes from human t lymphotropic virus type ii-infected persons. J Infect Dis, v. 177, n. 6, p. 1489-1496, 1998.

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, v. 94, n. 1, p. 13-18, 1999.

DOURADO, I.; ALCANTARA, L. C.; BARRETO, M. L.; DA GLORIA TEIXEIRA, M.; GALVAO-CASTRO, B. Htlv-i in the general population of salvador, brazil: A city with african ethnic and sociodemographic characteristics. J Acquir Immune Defic Syndr, v. 34, n. 5, p. 527-531, 2003.

EDLICH, R. F.; ARNETTE, J. A.; WILLIAMS, F. M. Global epidemic of human t-cell lymphotropic virus type-i (htlv-i). J Emerg Med, v. 18, n. 1, p. 109-119, 2000.

FAKHFAKH, M. A.; FOURNET, A.; PRINA, E.; MOUSCADET, J. F.; FRANCK, X.; HOCQUEMILLER, R.; FIGADERE, B. Synthesis and biological evaluation of substituted quinolines: Potential treatment of protozoal and retroviral co-infections. Bioorg Med Chem, v. 11, n. 23, p. 5013-5023, 2003.

FERREIRAJR, O. C.; PLANELLES, V.; ROSENBLATT, J. D. Human t-cell leukemia viruses: Epidemiology, biology, and pathogenesis. Blood Rev, v. 11, n. 2, p. 91-104, 1997.

FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUNOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; BRUNETON, J. 2-substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. Antimicrob Agents Chemother, v. 37, n. 4, p. 859-863, 1993.

FOURNET, A.; MAHIEUX, R.; FAKHFAKH, M. A.; FRANCK, X.; HOCQUEMILLER, R.; FIGADERE, B. Substituted quinolines induce inhibition of proliferation of htlv-1 infected cells. Bioorg Med Chem Lett, v. 13, n. 5, p. 891-894, 2003.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ROJAS DE ARIAS, A.; TORRES DE ORTIZ, S.; FUENTES, S.; NAKAYAMA, H.; SCHININI, A.; HOCQUEMILLER, R. In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by leishmania amazonensis. Antimicrob Agents Chemother, v. 40, n. 11, p. 2447-2451, 1996.

FOURNET, A.; GANTIER, J. C.; GAUTHERET, A.; LEYSALLES, L.; MUNOS, M. H.; MAYRARGUE, J.; MOSKOWITZ, H.; CAVE, A.; HOCQUEMILLER, R. The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in balb/c mice infected with leishmania donovani. J Antimicrob Chemother, v. 33, n. 3, p. 537-544, 1994.

FURNIA, A.; LAL, R.; MALONEY, E.; WIKTOR, S.; PATE, E.; RUDOLPH, D.; WATERS, D.; BLATTNER, W.; MANNS, A. Estimating the time of htlv-i infection following mother-to-child transmission in a breast-feeding population in jamaica. J Med Virol, v. 59, n. 4, p. 541-546, 1999.

GABET, A. S.; MORTREUX, F.; CHARNEAU, P.; RIOU, P.; DUC-DODON, M.; WU, Y.; JEANG, K. T.; WATTEL, E. Inactivation of htert transcription by tax. Oncogene, v. 22, n. 24, p. 3734-3741, 2003.

GALLO, D.; PENNING, L. M.; HANSON, C. V. Detection and differentiation of antibodies to human t-cell lymphotropic virus types i and ii by the immunofluorescence method. J Clin Microbiol, v. 29, n. 10, p. 2345-2347, 1991.

GALVAO-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, v. 37, n. 2, p. 242-243, 1997.

GANTIER, J. C.;FOURNET, A.;MUNOS, M. H. ;HOCQUEMILLER, R. The effect of some 2-substituted quinolines isolated from galipea longiflora on plasmodium vinckei petteri infected mice. Planta Med, v. 62, n. 3, p. 285-286, 1996.

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, v. 2, n. 8452, p. 407-410, 1985.

GOMES, I.;MELO, A.;PROIETTI, F. A.;MORENO-CARVALHO, O.;LOURES, L. A.;DAZZA, M. C.;SAID, G.;LAROUZE, B. ;GALVAO-CASTRO, B. Human t lymphotropic virus type i (htlv-i) infection in neurological patients in salvador, bahia, brazil. J Neurol Sci, v. 165, n. 1, p. 84-89, 1999.

GONCALVES, D. U.;GUEDES, A. C.;CARNEIRO-PROIETTI, A. B. ;LAMBERTUCCI, J. R. Htlv-i associated infective dermatitis may be an indolent htlv-i associated lymphoma. Braz J Infect Dis, v. 4, n. 2, p. 100-102, 2000.

GOON, P. K.;IGAKURA, T.;HANON, E.;MOSLEY, A. J.;ASQUITH, B.;GOULD, K. G.;TAYLOR, G. P.;WEBER, J. N. ;BANGHAM, C. R. High circulating frequencies of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-2-secreting human t-lymphotropic virus type 1 (htlv-1)-specific cd4+ t cells in patients with htlv-1-associated neurological disease. J Virol, v. 77, n. 17, p. 9716-9722, 2003.

GRANT, C.;BARMAK, K.;ALEFANTIS, T.;YAO, J.;JACOBSON, S. ;WIGDAHL, B. Human t cell leukemia virus type i and neurologic disease: Events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. J Cell Physiol, v. 190, n. 2, p. 133-159, 2002.

HANCHARD, B.;LAGRENADE, L.;CARBERRY, C.;FLETCHER, V.;WILLIAMS, E.;CRANSTON, B.;BLATTNER, W. A. ;MANN, A. Childhood infective dermatitis evolving into adult t-cell leukaemia after 17 years. Lancet, v. 338, n. 8782-8783, p. 1593-1594, 1991.

HANON, E.;HALL, S.;TAYLOR, G. P.;SAITO, M.;DAVIS, R.;TANAKA, Y.;USUKU, K.;OSAME, M.;WEBER, J. N. ;BANGHAM, C. R. Abundant tax protein expression in cd4+ t cells infected with human t-cell lymphotropic virus type i (htlv-i) is prevented by cytotoxic t lymphocytes. Blood, v. 95, n. 4, p. 1386-1392, 2000.

HERMINE, O.;ALLARD, I.;LEVY, V.;ARNULF, B.;GESSAIN, A. ;BAZARBACHI, A. A prospective phase ii clinical trial with the use of zidovudine and interferon-alpha in the acute and lymphoma forms of adult t-cell leukemia/lymphoma. Hematol J, v. 3, n. 6, p. 276-282, 2002.

HERMINE, O.;BOUSCARY, D.;GESSAIN, A.;TURLURE, P.;LEBLOND, V.;FRANCK, N.;BUZYN-VEIL, A.;RIO, B.;MACINTYRE, E.;DREYFUS, F. ;ET AL. Brief report:

Treatment of adult t-cell leukemia-lymphoma with zidovudine and interferon alfa. N Engl J Med, v. 332, n. 26, p. 1749-1751, 1995.

HERMINE, O.;DOMBRET, H.;POUPON, J.;ARNULF, B.;LEFRERE, F.;ROUSSELOT, P.;DAMAJ, G.;DELARUE, R.;FERMAND, J. P.;BROUET, J. C.;DEGOS, L.;VARET, B.;DE THE, H. ;BAZARBACHI, A. Phase ii trial of arsenic trioxide and alpha interferon in patients with relapsed/refractory adult t-cell leukemia/lymphoma. Hematol J, v. 5, n. 2, p. 130-134, 2004.

HIDAKA, M.;INOUE, J.;YOSHIDA, M. ;SEIKI, M. Post-transcriptional regulator (rex) of htlv-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. Embo J, v. 7, n. 2, p. 519-523, 1988.

HINO, S.;SUGIYAMA, H.;DOI, H.;ISHIMARU, T.;YAMABE, T.;TSUJI, Y. ;MIYAMOTO, T. Breaking the cycle of htlv-i transmission via carrier mothers' milk. Lancet, v. 2, n. 8551, p. 158-159, 1987.

HINUMA, Y.;NAGATA, K.;HANAOKA, M.;NAKAI, M.;MATSUMOTO, T.;KINOSHITA, K. I.;SHIRAKAWA, S. ;MIYOSHI, I. Adult t-cell leukemia: Antigen in an atl cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 78, n. 10, p. 6476-6480, 1981.

HIRAYAMA, M.;MIYADAI, T.;YOKOCHI, T.;SATO, K.;KUBOTA, T.;IIDA, M. ;FUJIKI, N. Infection of human t-lymphotropic virus type i to astrocytes in vitro with induction of the class ii major histocompatibility complex. Neurosci Lett, v. 92, n. 1, p. 34-39, 1988.

HOFFMAN, P. M.;DHIB-JALBUT, S.;MIKOVITS, J. A.;ROBBINS, D. S.;WOLF, A. L.;BERGEY, G. K.;LOHREY, N. C.;WEISLOW, O. S. ;RUSCETTI, F. W. Human t-cell leukemia virus type i infection of monocytes and microglial cells in primary human cultures. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 89, n. 24, p. 11784-11788, 1992.

HORIE, R.;WATANABE, T. ;UMEZAWA, K. Blocking nf-kappab as a potential strategy to treat adult t-cell leukemia/lymphoma. Drug News Perspect, v. 19, n. 4, p. 201-209, 2006.

IJICHI, S.;MATSUDA, T.;MARUYAMA, I.;IZUMIHARA, T.;KOJIMA, K.;NIIMURA, T.;MARUYAMA, Y.;SONODA, S.;YOSHIDA, A. ;OSAME, M. Arthritis in a human t lymphotropic virus type i (htlv-i) carrier. Ann Rheum Dis, v. 49, n. 9, p. 718-721, 1990.

ITOYAMA, Y.;MINATO, S.;KIRA, J.;GOTO, I.;SATO, H.;OKOCHI, K. ;YAMAMOTO, N. Spontaneous proliferation of peripheral blood lymphocytes increased in patients with htlv-i-associated myelopathy. Neurology, v. 38, n. 8, p. 1302-1307, 1988.

JACOBSON, S.;SHIDA, H.;MCFARLIN, D. E.;FAUCI, A. S. ;KOENIG, S. Circulating cd8+ cytotoxic t lymphocytes specific for htlv-i px in patients with htlv-i associated neurological disease. Nature, v. 348, n. 6298, p. 245-248, 1990.

JEFFERY, K. J.;SIDDIQUI, A. A.;BUNCE, M.;LLOYD, A. L.;VINE, A. M.;WITKOVER, A. D.;IZUMO, S.;USUKU, K.;WELSH, K. I.;OSAME, M. ;BANGHAM, C. R. The influence of hla class i alleles and heterozygosity on the outcome of human t cell lymphotropic virus type i infection. J Immunol, v. 165, n. 12, p. 7278-7284, 2000.

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 U S A, v. 96, n. 7, p. 3848-3853, 1999.

JOHNSON, R. T.;GRIFFIN, D. E.;ARREGUI, A.;MORA, C.;GIBBS, C. J., JR.;CUBA, J. M.;TRELLES, L. ;VAISBERG, A. Spastic paraparesis and htlv-i infection in peru. Ann Neurol, v. 23 Suppl, n., p. S151-155, 1988.

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, v. 218, n. 4572, p. 571-573, 1982.

KAPLAN, M. H. Human retroviruses and neoplastic disease. Clin Infect Dis, v. 17 Suppl 2, n., p. S400-406, 1993.

KASHALA, O.;MARLINK, R.;ILUNGA, M.;DIESE, M.;GORMUS, B.;XU, K.;MUKEBA, P.;KASONGO, K. ;ESSEX, M. Infection with human immunodeficiency virus type 1 (hiv-1) and human t cell lymphotropic viruses among leprosy patients and contacts: Correlation between hiv-1 cross-reactivity and antibodies to lipoarabinomannan. J Infect Dis, v. 169, n. 2, p. 296-304, 1994.

KATAOKA, A.;IMAI, H.;INAYOSHI, S. ;TSUDA, T. Intermittent high-dose vitamin c therapy in patients with htlv-i associated myelopathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry, v. 56, n. 11, p. 1213-1216, 1993.

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 sero-positive mothers. Gann, v. 75, n. 2, p. 103-105, 1984.

KITAGAWA, T.;FUJISHITA, M.;TAGUCHI, H.;MIYOSHI, I. ;TADOKORO, H. Antibodies to htlv-i in japanese immigrants in brazil. Jama, v. 256, n. 17, p. 2342, 1986.

KITAJIMA, I.;MARUYAMA, I.;MARUYAMA, Y.;IJICHI, S.;EIRAKU, N.;MIMURA, Y. ;OSAME, M. Polyarthritits in human t lymphotropic virus type i-associated myelopathy. Arthritis Rheum, v. 32, n. 10, p. 1342-1344, 1989.

KRAMER, A.;JACOBSON, S.;REUBEN, J. F.;MURPHY, E. L.;WIKTOR, S. Z.;CRANSTON, B.;FIGUEROA, J. P.;HANCHARD, B.;MCFARLIN, D. ;BLATTNER, W. A. Spontaneous lymphocyte proliferation in symptom-free htlv-i positive jamaicans. Lancet, v. 2, n. 8668, p. 923-924, 1989.

KUBOTA, R.;KAWANISHI, T.;MATSUBARA, H.;MANNNS, 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, v. 161, n. 1, p. 482-488, 1998.

KURODA, Y.;TAKASHIMA, H.;IKEDA, A.;ENDO, C.;NESHIGE, R.;KAKIGI, R. ;SHIBASAKI, H. Treatment of htlv-i-associated myelopathy with high-dose intravenous gammaglobulin. J Neurol, v. 238, n. 6, p. 309-314, 1991.

LAGRENADE, L.;HANCHARD, B.;FLETCHER, V.;CRANSTON, B. ;BLATTNER, W. Infective dermatitis of jamaican children: A marker for htlv-i infection. Lancet, v. 336, n. 8727, p. 1345-1347, 1990.

LAIRMORE, M. D.;JACOBSON, S.;GRACIA, F.;DE, B. K.;CASTILLO, L.;LARREATEGUI, M.;ROBERTS, B. D.;LEVINE, P. H.;BLATTNER, W. A. ;KAPLAN, J. E. Isolation of human t-cell lymphotropic virus type 2 from guaymi indians in panama. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 87, n. 22, p. 8840-8844, 1990.

LAL, R. B. ;RUDOLPH, D. L. Constitutive production of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha from spontaneously proliferating t cells in patients with human t-cell lymphotropic virus type-i/ii. Blood, v. 78, n. 3, p. 571-574, 1991.

LEE, H. H.;WEISS, S. H.;BROWN, L. S.;MILDVAN, D.;SHORTY, V.;SARAVOLATZ, L.;CHU, A.;GINZBURG, H. M.;MARKOWITZ, N.;DES JARLAIS, D. C. ;ET AL.

Patterns of hiv-1 and htlv-i/ii in intravenous drug abusers from the middle atlantic and central regions of the USA. J Infect Dis, v. 162, n. 2, p. 347-352, 1990.

LI, H. C.;YASHIKI, S.;SONODA, J.;LOU, H.;GHOSH, S. K.;BYRNES, J. J.;LEMA, C.;FUJIYOSHI, T.;KARASUYAMA, M. ;SONODA, S. Green tea polyphenols induce apoptosis in vitro in peripheral blood t lymphocytes of adult t-cell leukemia patients. Jpn J Cancer Res, v. 91, n. 1, p. 34-40, 2000.

MACATONIA, S. E.;CRUICKSHANK, J. K.;RUDGE, P. ;KNIGHT, S. C. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with htlv-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. AIDS Res Hum Retroviruses, v. 8, n. 9, p. 1699-1706, 1992.

MAHIEUX, R. ;GESSAIN, A. [new human retroviruses: Htlv-3 and htlv-4]. Med Trop (Mars), v. 65, n. 6, p. 525-528, 2005.

MANEL, N.;KIM, F. J.;KINET, S.;TAYLOR, N.;SITBON, M. ;BATTINI, J. L. The ubiquitous glucose transporter glut-1 is a receptor for htlv. Cell, v. 115, n. 4, p. 449-459, 2003.

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, v. 51, n. 6, p. 886-891, 1992.

MANNS, A.;MURPHY, E. L.;WILKS, R.;HAYNES, G.;FIGUEROA, J. P.;HANCHARD, B.;BARNETT, M.;DRUMMOND, J.;WATERS, D.;CERNEY, M. ;ET AL. Detection of early human t-cell lymphotropic virus type i antibody patterns during seroconversion among transfusion recipients. Blood, v. 77, n. 4, p. 896-905, 1991.

MARINHO, J.;GALVAO-CASTRO, B.;RODRIGUES, L. C. ;BARRETO, M. L. Increased risk of tuberculosis with human t-lymphotropic virus-1 infection: A case-control study. J Acquir Immune Defic Syndr, v. 40, n. 5, p. 625-628, 2005.

MARSH, B. J. Infectious complications of human t cell leukemia/lymphoma virus type i infection. Clin Infect Dis, v. 23, n. 1, p. 138-145, 1996.

MASCARENHAS, R. E.;BRODSKY, C.;BARBOSA, G.;CLARENCIO, J.;ANDRADE-FILHO, A. S.;FIGUEIROA, F.;GALVAO-CASTRO, B. ;GRASSI, F. Peripheral blood mononuclear cells from individuals infected with human t-cell lymphotropic virus type 1

have a reduced capacity to respond to recall antigens. Clin Vaccine Immunol, v. 13, n. 5, p. 547-552, 2006.

MEKOUAR, K.;MOUSCADET, J. F.;DESMAELE, D.;SUBRA, F.;LEH, H.;SAVOURE, D.;AUCLAIR, C. ;D'ANGELO, J. Styrylquinoline derivatives: A new class of potent hiv-1 integrase inhibitors that block hiv-1 replication in cem cells. J Med Chem, v. 41, n. 15, p. 2846-2857, 1998.

MOCHIZUKI, M.;YAMAGUCHI, K.;TAKATSUKI, K.;WATANABE, T.;MORI, S. ;TAJIMA, K. Htlv-i and uveitis. Lancet, v. 339, n. 8801, p. 1110, 1992.

MOREIRA, E. D., JR.;RIBEIRO, T. T.;SWANSON, P.;SAMPAIO FILHO, C.;MELO, A.;BRITES, C.;BADARO, R.;TOEDTER, G.;LEE, H. ;HARRINGTON, W., JR. Seroepidemiology of human t-cell lymphotropic virus type i/ii in northeastern brazil. J Acquir Immune Defic Syndr, v. 6, n. 8, p. 959-963, 1993.

MORGAN, O. S.;RODGERS-JOHNSON, P.;MORA, C. ;CHAR, G. Htlv-1 and polymyositis in jamaica. Lancet, v. 2, n. 8673, p. 1184-1187, 1989.

MUNEISHI, H.;TAGUCHI, H.;SAWADA, T.;IKEZOE, T.;MATSUI, S.;TANAKA, S.;TANIGUCHI, T.;ONOUE, O. ;MIYOSHI, I. Prevalence of htlv-i in leprosy patients in two sanatoriums in japan. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, v. 17, n. 4, p. 380-383, 1998.

MURAI, K.;TACHIBANA, N.;SHIOIRI, S.;SHISHIME, E.;OKAYAMA, A.;ISHIZAKI, J.;TSUDA, K. ;MUELLER, N. Suppression of delayed-type hypersensitivity to ppd and pha in elderly htlv-i carriers. J Acquir Immune Defic Syndr, v. 3, n. 10, p. 1006-1009, 1990.

MURPHY, E. L.;HANCHARD, B.;FIGUEROA, J. P.;GIBBS, W. N.;LOFTERS, W. S.;CAMPBELL, M.;GOEDERT, J. J. ;BLATTNER, W. A. Modelling the risk of adult t-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human t-lymphotropic virus type i. Int J Cancer, v. 43, n. 2, p. 250-253, 1989.

MURPHY, E. L.;FIGUEROA, J. P.;GIBBS, W. N.;BRATHWAITE, A.;HOLDING-COBHAM, M.;WATERS, D.;CRANSTON, B.;HANCHARD, B. ;BLATTNER, W. A. Sexual transmission of human t-lymphotropic virus type i (htlv-i). Ann Intern Med, v. 111, n. 7, p. 555-560, 1989.

NAKAGAWA, M.;IZUMO, S.;IJICHI, S.;KUBOTA, H.;ARIMURA, K.;KAWABATA, M. ;OSAME, M. Htlv-i-associated myelopathy: Analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. J Neurovirol, v. 1, n. 1, p. 50-61, 1995.

NAKAMURA, T.;FURUYA, T.;NISHIURA, Y.;ICHINOSE, K.;SHIRABE, S. ;EGUCHI, K. Importance of immune deviation toward th1 in the early immunopathogenesis of human t-lymphotropic virus type i-associated myelopathy. Med Hypotheses, v. 54, n. 5, p. 777-782, 2000.

NAKASHIMA, K.;KAWAKAMI, A.;HIDA, A.;YAMASAKI, S.;NAKAMURA, H.;KAMACHI, M.;MIYASHITA, T.;TANAKA, F.;IZUMI, Y.;TAMAI, M.;IDA, H.;FURUYAMA, M.;KOJI, T.;NAKAMURA, T.;MIGITA, K.;ORIGUCHI, T. ;EGUCHI, K. Protection of mitochondrial perturbation by human t-lymphotropic virus type 1 tax through induction of bcl-xl expression. J Lab Clin Med, v. 142, n. 5, p. 341-347, 2003.

NAKAYAMA, H.;FERREIRA, M. E.;ROJAS DE ARIAS, A.;VERA DE BILBAO, N.;TORRES, S.;SCHININI, A. ;FOURNET, A. Experimental treatment of chronic trypanosoma cruzi infection in mice with 2-n-propylquinoline. Phytother Res, v. 15, n. 7, p. 630-632, 2001.

NAKAYAMA, H.;LOISEAU, P. M.;BORIES, C.;TORRES DE ORTIZ, S.;SCHININI, A.;SERNA, E.;ROJAS DE ARIAS, A.;FAKHFAKH, M. A.;FRANCK, X.;FIGADERE, B.;HOCQUEMILLER, R. ;FOURNET, A. Efficacy of orally administered 2-substituted quinolines in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniases. Antimicrob Agents Chemother, v. 49, n. 12, p. 4950-4956, 2005.

NISHIURA, Y.;NAKAMURA, T.;ICHINOSE, K.;SHIRABE, S.;TSUJINO, A.;GOTO, H.;FURUYA, T. ;NAGATAKI, S. Increased production of inflammatory cytokines in cultured cd4+ cells from patients with htlv-i-associated myelopathy. Tohoku J Exp Med, v. 179, n. 4, p. 227-233, 1996.

OH, U.;YAMANO, Y.;MORA, C. A.;OHAYON, J.;BAGNATO, F.;BUTMAN, J. A.;DAMBROSIA, J.;LEIST, T. P.;MCFARLAND, H. ;JACOBSON, S. Interferon-beta1a therapy in human t-lymphotropic virus type i-associated neurologic disease. Ann Neurol, v. 57, n. 4, p. 526-534, 2005.

OKOCHI, K. ;SATO, H. Transmission of atlv (htlv-i) through blood transfusion. Princess Takamatsu Symp, v. 15, n., p. 129-135, 1984.

OSAME, M. Review of who kagoshima meeting and diagnostic guidelines for ham/tsp. In: WILLIAM, A. B. (Ed.). Human retrovirology: Htlv. New York: Raven Press, Ltd, 1990. Review of who kagoshima meeting and diagnostic guidelines for ham/tsp, p.191-197

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, v. 1, n. 8488, p. 1031-1032, 1986.

OSAME, M.;IZUMO, S.;IGATA, A.;MATSUMOTO, M.;MATSUMOTO, T.;SONODA, S.;TARA, M. ;SHIBATA, Y. Blood transfusion and htlv-i associated myelopathy. Lancet, v. 2, n. 8498, p. 104-105, 1986.

PEDRAL-SAMPAIO, D. B.;MARTINS NETTO, E.;PEDROSA, C.;BRITES, C.;DUARTE, M. ;HARRINGTON, W., JR. Co-infection of tuberculosis and hiv/htlv retroviruses: Frequency and prognosis among patients admitted in a brazilian hospital. Braz J Infect Dis, v. 1, n. 1, p. 31-35, 1997.

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 U S A, v. 77, n. 12, p. 7415-7419, 1980.

PORTO, A. F.;SANTOS, S. B.;ALCANTARA, L.;GUERREIRO, J. B.;PASSOS, J.;GONZALEZ, T.;NEVA, F.;GONZALEZ, D.;HO, J. L. ;CARVALHO, E. M. Htlv-1 modifies the clinical and immunological response to schistosomiasis. Clin Exp Immunol, v. 137, n. 2, p. 424-429, 2004.

PORTO, M. A.;MUNIZ, A.;OLIVEIRA JUNIOR, J. ;CARVALHO, E. M. [clinical and immunological consequences of the association between htlv-1 and strongyloidiasis]. Rev Soc Bras Med Trop, v. 35, n. 6, p. 641-649, 2002.

PRIMO, J. R.;BRITES, C.;OLIVEIRA MDE, F.;MORENO-CARVALHO, O.;MACHADO, M. ;BITTENCOURT, A. L. Infective dermatitis and human t cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in childhood and adolescence. Clin Infect Dis, v. 41, n. 4, p. 535-541, 2005.

PRINCE, H.;KLEINMAN, S.;DOYLE, M.;LEE, H. ;SWANSON, P. Spontaneous lymphocyte proliferation in vitro characterizes both htlv-i and htlv-ii infection. J Acquir Immune Defic Syndr, v. 3, n. 12, p. 1199-1200, 1990.

PRINCE, H. E.;WEBER, D. M. ;JENSEN, E. R. Spontaneous lymphocyte proliferation in htlv-i/ii infection reflects preferential activation of cd8 and cd16/56 cell subsets. Clin Immunol Immunopathol, v. 58, n. 3, p. 419-430, 1991.

PRINCE, H. E.;JENSEN, E. R. ;YORK, J. Lymphocyte subsets in htlv-ii-infected former blood donors: Relationship to spontaneous lymphocyte proliferation. Clin Immunol Immunopathol, v. 65, n. 3, p. 201-206, 1992.

PRINCE, H. E.;YORK, J.;OWEN, S. M. ;LAL, R. B. Spontaneous proliferation of memory (cd45ro+) and naive (cd45ro-) subsets of cd4 cells and cd8 cells in human t lymphotropic virus (htlv) infection: Distinctive patterns for htlv-i versus htlv-ii. Clin Exp Immunol, v. 102, n. 2, p. 256-261, 1995.

PRINCE, H. E.;LEE, H.;JENSEN, E. R.;SWANSON, P.;WEBER, D.;FITZPATRICK, L.;DOYLE, M. ;KLEINMAN, S. Immunologic correlates of spontaneous lymphocyte proliferation in human t-lymphotropic virus infection. Blood, v. 78, n. 1, p. 169-174, 1991.

RIBAS, J. G.;MELO, G. C. ;CATALAN-SOARES, B. Htlv-1 familiar infection: Vertical transmission in three gerations. The 11th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. San Francisco, CA. June 2003, 2003. p.

SAITO, M.;NAKAGAWA, M.;KASEDA, S.;MATSUZAKI, T.;JONOSONO, M.;EIRAKU, N.;KUBOTA, R.;TAKENOUCI, N.;NAGAI, M.;FURUKAWA, Y.;USUKU, K.;IZUMO, S. ;OSAME, M. Decreased human t lymphotropic virus type i (htlv-i) provirus load and alteration in t cell phenotype after interferon-alpha therapy for htlv-i-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J Infect Dis, v. 189, n. 1, p. 29-40, 2004.

SAITO, S.;ANDO, Y.;FURUKI, K.;TANIGAWA, T.;KAKIMOTO, K.;MORIYAMA, I. ;ICHIJO, M. [detection of htlv-i genome in infants born to htlv-i seropositive mothers by polymerase chain reaction]. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi, v. 42, n. 3, p. 234-240, 1990.

SAJI, F.;TOKUGAWA, Y.;KAMIURA, S.;SAMEJIMA, Y.;OHASHI, K.;AZUMA, C. ;TANIZAWA, O. Vertical transmission of human t-cell leukemia virus type i (htlv-i): Detection of proviral DNA in htlv-i carrier gravida. J Clin Immunol, v. 9, n. 5, p. 409-414, 1989.

SANTOS, S. B.;PORTO, A. F.;MUNIZ, A. L.;DE JESUS, A. R.;MAGALHAES, E.;MELO, A.;DUTRA, W. O.;GOLLOB, K. J. ;CARVALHO, E. M. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of ham/tsp is observed in a large proportion of htlv-i asymptomatic carriers. BMC Infect Dis, v. 4, n. 1, p. 7, 2004.

SHIRABE, S.;NAKAMURA, T.;TSUJINO, A.;NISHIURA, Y.;FURUYA, T.;GOTO, H.;SUENAGA, A.;NAKANE, S.;YOSHIMURA, T. ;NAGATAKI, S. Successful

application of pentoxifylline in the treatment of htlv-i associated myelopathy. J Neurol Sci, v. 151, n. 1, p. 97-101, 1997.

SIBON, D.;GABET, A. S.;ZANDECKI, M.;PINATEL, C.;THETE, J.;DELFAU-LARUE, M. H.;RABAAOUI, S.;GESSAIN, A.;GOUT, O.;JACOBSON, S.;MORTREUX, F.;WATTEL, E. Htlv-1 propels untransformed cd4 lymphocytes into the cell cycle while protecting cd8 cells from death. J Clin Invest, v. 116, n. 4, p. 974-983, 2006.

SONODA, S.;FUJIYOSHI, T. ;YASHIKI, S. Immunogenetics of htlv-i/ii and associated diseases. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, v. 13 Suppl 1, n., p. S119-123, 1996.

STUVER, S. O. ;MUELLER, N. E. Re: "Sexual transmission of human t-lymphotropic virus type i among female prostitutes and among patients with sexually transmitted diseases in fukuoka, kyushu, japan". Am J Epidemiol, v. 142, n. 11, p. 1247-1248, 1995.

STUVER, S. O.;TACHIBANA, N.;OKAYAMA, A.;SHIOIRI, S.;TSUNETOSHI, Y.;TSUDA, K. ;MUELLER, N. E. Heterosexual transmission of human t cell leukemia/lymphoma virus type i among married couples in southwestern japan: An initial report from the miyazaki cohort study. J Infect Dis, v. 167, n. 1, p. 57-65, 1993.

SUGIMOTO, M. [interstitial pneumonia in patients with human t-cell lymphotropic virus type-1 infection]. Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi, v. 31 Suppl, n., p. 36-41, 1993.

SULLIVAN, M. T.;WILLIAMS, A. E.;FANG, C. T.;GRANDINETTI, T.;POIESZ, B. J. ;EHRlich, G. D. Transmission of human t-lymphotropic virus types i and ii by blood transfusion. A retrospective study of recipients of blood components (1983 through 1988). The american red cross htlv-i/ii collaborative study group. Arch Intern Med, v. 151, n. 10, p. 2043-2048, 1991.

SUZUKI, T.;UCHIDA-TOITA, M. ;YOSHIDA, M. Tax protein of htlv-1 inhibits cbp/p300-mediated transcription by interfering with recruitment of cbp/p300 onto DNA element of e-box or p53 binding site. Oncogene, v. 18, n. 28, p. 4137-4143, 1999.

TAKATSUKI, K. Adult t-cell leukemia. Intern Med, v. 34, n. 10, p. 947-952, 1995.

TAKESHITA, T. ;TAKESHITA, H. Crusted (norwegian) scabies in a patient with smoldering adult t-cell leukemia. J Dermatol, v. 27, n. 10, p. 677-679, 2000.

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, v. 73, n. 12, p. 10289-10295, 1999.

TAYLOR, G. P.;GOON, P.;FURUKAWA, Y.;GREEN, H.;BARFIELD, A.;MOSLEY, A.;NOSE, H.;BABIKER, A.;RUDGE, P.;USUKU, K.;OSAME, M.;BANGHAM, C. R.;WEBER, J. N. Zidovudine plus lamivudine in human t-lymphotropic virus type-i-associated myelopathy: A randomised trial. Retrovirology, v. 3, n., p. 63, 2006.

TOMITA, M.;KAWAKAMI, H.;UCHIHARA, J. N.;OKUDAIRA, T.;MASUDA, M.;MATSUDA, T.;TANAKA, Y.;OHSHIRO, K. ;MORI, N. Inhibition of constitutively active jak-stat pathway suppresses cell growth of human t-cell leukemia virus type 1-infected t-cell lines and primary adult t-cell leukemia cells. Retrovirology, v. 3, n., p. 22, 2006.

TREVISAN, R.;DAPRAI, L.;PALOSCHI, L.;VAJENTE, N.;CHIECO-BIANCHI, L. ;SAGGIORO, D. Antiapoptotic effect of human t-cell leukemia virus type 1 tax protein correlates with its creb transcriptional activity. Exp Cell Res, v. 312, n. 8, p. 1390-1400, 2006.

URETA-VIDAL, A.;ANGELIN-DUCLOS, C.;TORTEVOYE, P.;MURPHY, E.;LEPERE, J. F.;BUIGUES, R. P.;JOLLY, N.;JOUBERT, M.;CARLES, G.;POULIQUEN, J. F.;DE THE, G.;MOREAU, J. P. ;GESSAIN, A. Mother-to-child transmission of human t-cell-leukemia/lymphoma virus type i: Implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. Int J Cancer, v. 82, n. 6, p. 832-836, 1999.

VERNANT, J. C.;MAURS, L.;GESSAIN, A.;BARIN, F.;GOUT, O.;DELAPORTE, J. M.;SANHADJI, K.;BUISSON, G. ;DE-THE, G. Endemic tropical spastic paraparesis associated with human t-lymphotropic virus type i: A clinical and seroepidemiological study of 25 cases. Ann Neurol, v. 21, n. 2, p. 123-130, 1987.

WANG, X.;MIYAKE, H.;OKAMOTO, M.;SAITO, M.;FUJISAWA, J.;TANAKA, Y.;IZUMO, S. ;BABA, M. Inhibition of the tax-dependent human t-lymphotropic virus type i replication in persistently infected cells by the fluoroquinolone derivative k-37. Mol Pharmacol, v. 61, n. 6, p. 1359-1365, 2002.

WATANABE, M.; OHSUGI, T.; SHODA, M.; ISHIDA, T.; AIZAWA, S.; MARUYAMA-NAGAI, M.; UTSUNOMIYA, A.; KOGA, S.; YAMADA, Y.; KAMIHIRA, S.; OKAYAMA, A.; KIKUCHI, H.; UOZUMI, K.; YAMAGUCHI, K.; HIGASHIHARA, M.; UMEZAWA, K.; WATANABE, T. ; HORIE, R. Dual targeting of transformed and untransformed htlv-1-infected t cells by dhmeq, a potent and selective inhibitor of nf-

kappab, as a strategy for chemoprevention and therapy of adult t-cell leukemia. Blood, v. 106, n. 7, p. 2462-2471, 2005.

WATTEL, E.; CAVROIS, M.; GESSAIN, A.; WAIN-HOBSON, S. Clonal expansion of infected cells: A way of life for htlv-i. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, v. 13 Suppl 1, n., p. S92-99, 1996.

WELLES, S. L.; TACHIBANA, N.; OKAYAMA, A.; SHIOIRI, S.; ISHIHARA, S.; MURAI, K.; MUELLER, N. E. Decreased reactivity to ppd among htlv-i carriers in relation to virus and hematologic status. Int J Cancer, v. 56, n. 3, p. 337-340, 1994.

WOLFE, N. D.; HENEINE, W.; CARR, J. K.; GARCIA, A. D.; SHANMUGAM, V.; TAMOUFE, U.; TORIMIRO, J. N.; PROSSER, A. T.; EBRETON, M.; MPOUDINGOLE, E.; MCCUTCHAN, F. E.; BIRX, D. L.; FOLKS, T. M.; BURKE, D. S.; SWITZER, W. M. Emergence of unique primate t-lymphotropic viruses among central african bushmeat hunters. Proc Natl Acad Sci U S A, v. 102, n. 22, p. 7994-7999, 2005.

YAKOVA, M.; LEZIN, A.; DANTIN, F.; LAGATHU, G.; OLINDO, S.; JEAN-BAPTISTE, G.; ARFI, S.; CESAIRE, R. Increased proviral load in htlv-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. Retrovirology, v. 2, n. 1, p. 4, 2005.

YAMASAKI, K.; KIRA, J.; KOYANAGI, Y.; KAWANO, Y.; MIYANO-KUROSAKI, N.; NAKAMURA, M.; BABA, E.; SUZUKI, J.; YAMAMOTO, A.; YAMAMOTO, N.; KOBAYASHI, T. Long-term, high dose interferon-alpha treatment in htlv-i-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: A combined clinical, virological and immunological study. J Neurol Sci, v. 147, n. 2, p. 135-144, 1997.

ZOUHIRI, F.; MOUSCADET, J. F.; MEKOUAR, K.; DESMAELE, D.; SAVOURE, D.; LEH, H.; SUBRA, F.; LE BRET, M.; AUCLAIR, C.; D'ANGELO, J. Structure-activity relationships and binding mode of styrylquinolines as potent inhibitors of hiv-1 integrase and replication of hiv-1 in cell culture. J Med Chem, v. 43, n. 8, p. 1533-1540, 2000.