

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

ESTUDO DA ATIVAÇÃO E DA RESPOSTA AOS ANTÍGENOS DE MEMÓRIA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1

RITA ELIZABETH MOREIRA MASCARENHAS

Rio de Janeiro

2006



003708

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

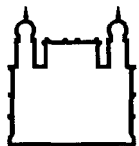
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**ESTUDO DA ATIVAÇÃO E DA RESPOSTA AOS ANTÍGENOS DE
MEMÓRIA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1**

RITA ELIZABETH MOREIRA MASCARENHAS

Rio de Janeiro

2006



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

RITA ELIZABETH MOREIRA MASCARENHAS

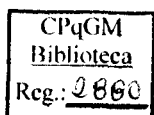
Estudo da Ativação e da Resposta aos Antígenos de Memória em Indivíduos Infectados pelo HTV-1

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador (es): Prof. Dr. Bernardo Gavão Castro
Profa. Dra. Maria Fernanda Rios Grassi

RIO DE JANEIRO

2006



Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FOCRUZ - RJ

M395 Mascarenhas, Rita Elizabeth Moreira

Estudo da ativação e da resposta aos antígenos de memória em indivíduos infectados pelo HTLV-1 / Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas. – Salvador, 2006.

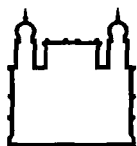
x, 92 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Biologia Celular e Molecular, 2006.

Bibliografia: f. 45-60.

1. Vírus 1 linfótico T humano. 2. Imunossupressão. 3. Memória imunológica. 4. Ativação linfocítica. I. Título.

CDD:616.9792



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e molecular

RITA ELIZABETH MOREIRA MASCARENHAS

**ESTUDO DA ATIVAÇÃO E DA RESPOSTA AOS ANTÍGENOS DE MEMÓRIA EM
INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Bernardo Gavão Castro
Profa. Dra. Maria Fernanda Rios Grassi

Aprovada em: 29/03/2006

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Edgar Marcelino de Carvalho - Presidente
Prof. Dr. Carlos Roberto Brites Alves
Prof. Dra. Claudia Ida Brodskyn

Rio de Janeiro, 29 de março de 2006

Ao meu pai, Boanerges Moreira da Silva, dedico este trabalho e toda a minha trajetória na área da saúde.

AGRADECIMENTOS

A Dr. Bernardo Galvão Castro uma grande admiração e muitos agradecimentos: pelo acolhimento neste laboratório desde 1996 quando comecei o mestrado, pela oportunidade de continuar no LASP para desenvolver o doutorado, pela orientação desta tese, e pelos exemplos de sabedoria.

A Dra Fernanada Grassi, com quem tive o privilégio de trabalhar nos últimos cinco anos, meus agradecimentos pela orientação desta tese, pela paciência durante este exercício, e especialmente, pelos exemplos de honestidade, igualdade e justiça.

Ao meu marido, Antonio Henrique, pelo companheirismo e paciência, especialmente no.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação e pelos exemplos de honestidade e justiça.

período da realização deste trabalho.

Aos amigos Marco e Sandra e Viviana, pelo carinho, incentivo e apoio sempre dispensados a mim.

A Luis Carlos Alcântara, pela amizade e carinho, bem como pela oportunidade de trabalharmos juntos.

A Sergio Pereira, pela sua alegria e amizade, e pelas palavras de coragem e perseverança.

Por todas as pessoas do grupo imuno/HTLV-HIV: Viviana, Zilma, Caciane, Anininha, Jairo, Saulo e Luciana, bem como aos que já fizeram parte do nosso grupo, pelo companheirismo, apoio e paciência.

A todas as pessoas da secretaria, D. Eugênia, Elisabeth Deliége, Cláudio Paulo e Rodrigo, pela disponibilidade, apoio e pelo carinho dispensados.

A Noilson e Jurema, pela amizade e pelo apoio na realização deste trabalho.

A todo o grupo do Centro de Referência para portadores do HTLV, da Fundação Bahiana para o desenvolvimento das Ciências, pela possibilidade de participar do grupo e de realizar este trabalho.

A Dr. Sonia Loppo pela colaboração e pela seleção de um grupo de pacientes.

A Fundação Bahiana de Neurologia e Neurocirurgia, pelo acesso aos pacientes e obtenção das amostras para a realização deste trabalho.

Às toas as pessoas do laboratório LET, especialmente os estudantes Fernando, Ricardo e Matheus, que gentilmente sempre me receberam e realizaram as leituras no beta-counter.

Ao curso de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular/IOC, no qual realizei o doutorado.

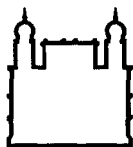
A Cleide e Eliete, da secretaria da pós-graduação em Biologia Celular e Molecular/IOC, pelo apoio e disponibilidade.

À Fundação para o Desenvolvimento das Ciências/Faculdade Bahiana de Medicina e Saúde Pública por todo o apoio na realização deste trabalho.

A Direção do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pela possibilidade de desenvolver este estudo.

Aos órgãos financiadores CNPq, FAPESB.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

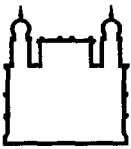
ESTUDO DA ATIVAÇÃO E DA RESPOSTA AOS ANTÍGENOS DE MEMÓRIA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) tem tropismo para os linfócitos T, infectando preferencialmente linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺, embora outras células possam ser alvo da infecção. No Brasil, a prevalência em doadores de sangue foi estimada em 0,45%, sendo Salvador o epicentro da infecção do HTLV-1 no país, com prevalência de 1,35%. Recentemente, um estudo de base populacional, realizado na em Salvador revelou uma prevalência de 2%. O HTLV-1 está classicamente associado a leucemia e linfoma de células T do adulto (ATLL), Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) e uveíte. Este vírus também está relacionado a outras doenças inflamatórias como artrite, dermatite infecciosa, polimiosite, alveolite e Síndrome de Sjögren. A infecção pelo HTLV-1, induz uma ativação crônica do sistema imune e uma maior susceptibilidade a doenças infecciosas. Maior morbidade e mortalidade associada à tuberculose, hanseníase, estrongiloidíase grave e disseminada, e escabiose severa sugerem a existência de uma imunossupressão pelo HTLV-1. Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de cerca de 50% dos indivíduos infectados, apresentam proliferação espontânea *in vitro*, uma das alterações imunológicas características da infecção por este vírus. Neste estudo, avaliamos a resposta imune celular aos antígenos de memória nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentando ou não proliferação espontânea. Inicialmente, quantificamos as populações de linfócitos T CD4 e CD8 e estudamos o repertório do TCR-V β das subpopulações dos linfócitos T CD4⁺. Encontramos um aumento da proporção dos linfócitos T CD4⁺CD45RO⁺, nos indivíduos infectados com proliferação espontânea e uma menor frequência de resposta aos antígenos de memória, mesmo nos indivíduos cujos PBMC não proliferavam espontaneamente. Além disso, indivíduos com proliferação espontânea apresentaram expansão policlonal dos linfócitos T CD4⁺. Em seguida, investigamos o perfil de ativação e a frequência de células produtoras de IFN- γ . A expressão de CD25, CD69 e HLA-DR, bem como a proporção de células produtoras de IFN- γ foi maior nos linfócitos T CD4⁺ dos indivíduos infectados pelo HTLV-1. Por fim, investigamos o potencial inibitório de compostos quinolínicos na proliferação espontânea de linfócitos T, de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Identificamos seis compostos (XF907, XF731, SF103, MHM22, MDS14 and SF47) com capacidade para inibir, *in vitro*, a proliferação espontânea de PBMC. Novos estudos para avaliar o mecanismo de inibição destas drogas devem ser realizados. A descoberta de novos fármacos é importante para o tratamento desta infecção. Nossos resultados indicam que o HTLV-1 induz uma imunossupressão caracterizada pela redução na frequência de respostas positivas aos antígenos de memória, mesmo entre os indivíduos que não apresentam proliferação espontânea, sugerindo que possa ocorrer uma imunossupressão. A ativação celular e frequências elevadas de células produtoras de IFN- γ podem contribuir para esta anergia.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DA ATIVAÇÃO E DA RESPOSTA AOS ANTÍGENOS DE MEMÓRIA EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas

Human T-lymphotropic virus cells type I (HTLV-1) presents tropism for T lymphocytes, infecting preferentially CD4⁺CD45RO⁺ T-lymphocytes, although other cells may be infected. In Brazil, the prevalence in blood donors was estimated in 0.45%. Salvador is the epicenter of the infection in the country, with the prevalence of 1.35%. A population-based study in Salvador demonstrated a prevalence of 2%. HTLV-1 infection is classically associated to adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), HAM/TSP and uveitis. This virus is also associated to other inflammatory diseases such as arthritis, infective dermatitis, polymyositis, alveolitis, and Sjögren syndrome. HTLV-1 infection induces a chronic activation of the immune system and a high susceptibility to infectious diseases. In fact, high morbidity and mortality associated to tuberculosis, Hansen's disease, disseminated strongyloidiasis, severe scabies suggest the existence of an immunosuppression in HTLV-1 infection. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of infected individuals present spontaneous proliferation *in vitro*, an immunological alteration that is a characteristic of the infection by this virus. In this study we evaluated the cellular immune response to recall antigens in the HTLV-1-infected individuals, presenting or not spontaneous proliferation. First, we quantified the CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocyte subsets and studied the TCR-V β repertoire from CD4⁺ lymphocytes. We found an increase of the CD4⁺CD45RO⁺ T-lymphocytes in the individuals infected with spontaneous proliferation. The response frequency to the memory antigens were decreased in the HTLV-1-infected individuals, even in the absence of spontaneous proliferation. Then, we investigated the activation profile, as well as the frequencies of IFN- γ producing cells. The expression of CD25, CD69, and HLA-DR, as well as IFN- γ was higher in CD4⁺ T-lymphocyte from HTLV-1-infected individuals. Finally, we investigated the inhibitory potential of quinoline compounds on the spontaneous proliferation of T-lymphocyte of HTLV-1-infected individuals. We identified six compounds (XF907, XF731, SF103, MHM22, MDS14 and SF47) with capacity to inhibit, *in vitro*, the spontaneous proliferation of PBMC. New studies to evaluate the inhibition mechanism of these drugs should be done. The discovery of new drugs is important for the treatment of this infection. In conclusion, our results suggest that HTLV-1-infected individuals have immunosuppression, as reflected by a decrease in stimulation index to recall antigens, even in individuals without spontaneous PBMC proliferation. The cellular activation and high frequencies of IFN- γ producing cells can contribute to this immunosuppression.

Lista de abreviaturas

HTLV-1	Vírus linfotrófico de células T humanas tipo 1
ATLV	Vírus da leucemia de células T do adulto
TSP	Paraparesia espástica tropical
HAM	Mielopatia associada ao HTLV-1
HAM/TSP	Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1
ATLL	Leucemia e linfoma de células T do adulto
ATLV	Vírus da leucemia de células T do adulto
HLA	Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe I
CD	“Cluster differentiation” (marcador de membrana)
CREB	Proteína ligadora do elemento responsivo ao AMPc
LTR	Seqüências terminais longas repetidas
SRF	Fator responsivo do soro
IL-2	Interleucina 2
IL-2R	Receptor de interleucina 2
IL-12	Interleucina 12
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
TNF- α	Fator de necrose tumoral
IFN- γ	Interferon gama
TCR	Receptor de célula T
CTL	Linfócitos T citotóxicos
PPD	Proteína purificada derivada do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
PFA	Paraformaldeído
BSA	Soro albumina bovina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
PC	Ficoeritricianina
PE	Ficoeritrina

SUMÁRIO

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de abreviaturas	ix
1. Capítulo I - Introdução	1
1.1 Introdução	1
1.2 Revisão de literatura	4
1.2.1 Alterações imunes na infecção pelo HTLV-1	8
2. Objetivos	17
3. Capítulo II	
<i>Peripheral blood mononuclear cells from individuals infected with T-cell Lymphotropic Virus type-I (HTLV-I) have a reduced capacity to respond to recall antigens</i>	18
4. Capítulo III	
<i>Avaliação do perfil de ativação e da produção de IFN-γ dos linfócitos T de indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)</i>	20
5. Capítulo IV	
<i>Quinoline compounds decrease in vitro spontaneous proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from Human T-cell Lymphotropic Virus type-I (HTLV-I)-infected individuals</i>	21
6. Discussão	22
7. Conclusões	29
8. Perspectivas	30
9. Referências Bibliográficas	31
10. Anexo : manuscrito publicado durante o curso do doutorado	47

1. Capítulo I

1.1 Introdução

No início dos anos 70, alguns pesquisadores já estudavam retrovírus animais causadores de leucemias, pois acreditavam que a compreensão dos mecanismos leucêmicos em animais forneceria informações sobre os mecanismos envolvidos na leucemia humana. Assim, a descoberta de retrovírus associados a leucemias em felinos (Jarrett 1970), em uma espécie de macaco, Gibbon (Charman, Kim et al. 1975) e em bovinos (Ferrer, Bhatt et al. 1975) motivaram a busca de um retrovírus como agente etiológico da leucemia humana.

Em 1979, Robert Gallo e seus colaboradores finalmente isolaram o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1), a partir de uma linhagem linfocitária obtida de amostras de um paciente com linfoma cutâneo de células T (Poiesz, Ruscetti et al. 1980). Eles demonstraram que o HTLV-1 era o agente da leucemia, devido a presença de anticorpos específicos existentes no soro destes pacientes, e a observação do DNA proviral integrado ao DNA das células infectadas (Poiesz, Ruscetti et al. 1980).

Na mesma época, e de modo independente, pesquisadores japoneses isolaram um retrovírus a partir de células leucêmicas de pacientes com uma leucemia descrita no Sudeste do Japão, conhecida como leucemia de células T do adulto (ATL) (Uchiyama, Yodoi et al. 1977). O vírus isolado foi denominado vírus da leucemia de células T do adulto (ATLV) (Hinuma, Nagata et al. 1981). Posteriormente, análises comparativas dos isolados ATL e HTLV demonstraram tratar-se de um mesmo vírus, o HTLV-1 (Watanabe, Seiki et al. 1984).

Logo após o isolamento do vírus, a atenção dos pesquisadores voltou-se para as alterações nas células infectadas pelo HTLV-1. Estas células mantinham

um fenótipo de células T maduras, e podiam propagar-se espontaneamente em culturas, na ausência de fatores de crescimento (Popovic, Lange-Wantzin et al. 1983; Jacobson, Raine et al. 1988; Richardson, Edwards et al. 1990; Prince, Lee et al. 1991). Vários trabalhos têm relatado a proliferação espontânea nas culturas de linfócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Muitos apontavam para uma associação entre proliferação e doença (Kramer, Jacobson et al. 1989; Lunardi-Iskandar, Gessain et al. 1993). A proliferação espontânea é descrita como uma das alterações imunológicas mais característica da infecção pelo HTLV-1, mas sua implicação na patogênese ainda não está esclarecida.

Em 1981, um outro retrovirus, o HTLV-2, foi isolado de um tipo raro de leucemia, descrita como leucemia de células T cabeludas (Kalyanaraman, Sarngadharan et al. 1982). Apesar de possuir grande homologia com o HTLV-1, o HTLV-2 não está classicamente associado a nenhuma doença humana até o momento. Entretanto, algumas alterações neurológicas são descritas em indivíduos cronicamente infectados por este vírus (Jacobson, Lehky et al. 1993; Peters, Oger et al. 1999; Biglione, Pizarro et al. 2003). Recentemente, outros tipos virais foram isolados, o HTLV-3 (Calattini, Chevalier et al. 2005) e o HTLV-4 (Wolfe, Heneine et al. 2005), mas até o momento não foram associados a patologias.

Em 1985, a infecção pelo HTLV-I passou a ser relacionada a doenças neurológicas. A associação entre HTLV-1 e paraparesia espástica tropical (TSP) foi inicialmente identificada por Guy De The e colaboradores, na Martinica, onde o vírus estava presente em 59% dos pacientes com TSP (Gessain, Barin et al. 1985). No ano seguinte, o HTLV-1 foi associado a uma mielopatia freqüente em Kagoshima, no Japão, que recebeu a denominação mielopatia associada ao HTLV-I (HAM) (Osame, Usuku et al. 1986). Em 1989, um consenso recomendou a denominação paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP), por tratar-se de uma mesma entidade clínica (Osame 1990). Os critérios para o diagnóstico da HAM/TSP foram estabelecidos no ano seguinte (Osame 1990).

O HTLV-I também está relacionado a outras doenças inflamatórias como uveíte, artrite, dermatite infectiva, polimiosite, alveolite e Síndrome de Sjogren (Morgan, Rodgers-Johnson et al. 1989; Ijichi, Matsuda et al. 1990; LaGrenade, Hanchard et al. 1990; Mochizuki, Yamaguchi et al. 1992; Sugimoto 1993). As diversas manifestações clínicas até o momento associadas a este vírus sugerem que a doença apresenta um caráter sistêmico. Alguns pesquisadores sugerem o conceito de síndrome para as manifestações clínicas decorrentes desta infecção (Carneiro-Proietti, Ribas et al. 2002).

Se por um lado, a infecção crônica pelo HTLV-1 está associada a doenças com características inflamatórias e neoplásicas, por outro, várias evidências clínicas sugerem que pode haver um grau de imunossupressão. Uma maior morbidade e mortalidade associadas a diversas doenças infecciosas como tuberculose (Moreira, Ribeiro et al. 1993; Pedral-Sampaio, Martins Netto et al. 1997)(Marinho, Galvao-Castro et al. 2005), hanseníase (Tekle-Haimanot, Frommel et al. 1991; Kashala, Marlink et al. 1994), estrogiloidíase (Sato and Shiroma 1989; Porto, Neva et al. 2001; Porto, Muniz et al. 2002), e escabiose severa (Takeshita and Takeshita 2000; Brites, Weyll et al. 2002; Blas, Bravo et al. 2005) em indivíduos infectados pelo HTLV-1, reforçam esta hipótese.

O HTLV-1 induz diversas manifestações clínicas, sugerindo mecanismos patogênicos complexos e multifatoriais. Assim, nos interessamos em estudar as alterações da resposta imune em indivíduos infectados pelo HTLV-1, particularmente relacionadas à proliferação espontânea. Inicialmente, quantificamos a frequência das subpopulações linfocitárias T e avaliamos a resposta aos antígenos de memória dos indivíduos infectados.

Nossa hipótese é que as alterações imunes precoces induzidas pelo HTLV-1, como a proliferação e a ativação celular, podem estar implicadas em algum grau de imunossupressão.

Em seguida, realizamos um estudo fenotípico dos linfócitos T de indivíduos infectados pelo HTLV-1, avaliando o grau de ativação. Finalmente, estudamos o papel de compostos quinolínicos na modulação da proliferação espontânea.

1.2. Revisão de literatura

O HTLV-I está classificado na família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae*, gênero deltavirus. É um vírus envelopado de 100 a 140 nm de diâmetro que contém um core central de 80-100 nm de diâmetro, composto pelas proteínas p15 (proteína associada ao nucleocapsídeo), p24 (proteína do capsídeo) e p19 (proteína da matriz). O interior do nucleocapsídeo contém duas fitas simples de RNA e as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease. O genoma viral, constituído de RNA diplóide de 8,5 kb, está localizado dentro do nucleocapsídeo, junto às outras proteínas envolvidas no ciclo de replicação viral, como a transcriptase reversa, a integrase e a protease. O envelope, de natureza lipoprotéica, é originado da membrana plasmática da célula infectada, e apresenta duas subunidades virais protéicas, glicosiladas, inseridas no envelope: a proteína de superfície, gp46, e a proteína transmembrana, gp21.

A estrutura genética do HTLV consiste de três genes estruturais clássicos: *gag* (grupo antígeno específico do core), *pol* (polimerase), *env* (envelope); e uma região regulatória pX, que codifica as proteínas Tax e Rex. O genoma é flanqueado por duas seqüências terminais longas repetidas idênticas (LTR) (Kohtz, Altman et al. 1988).

O HTLV-I tem tropismo para os linfócitos T, infectando preferencialmente linfócitos T CD4+CD45RO+ do sangue periférico, embora outros tipos celulares como linfócitos T CD8+, células da glia e células dendríticas circulantes possam igualmente constituir um alvo para a infecção (Popovic, Lange-Wantzin et al. 1983; Richardson, Edwards et al. 1990; Macatonia, Cruickshank et al. 1992; Hollsberg 1999).

A infecção das células-alvo inicia-se pela interação entre a proteína viral de superfície, gp46, e a superfície da membrana celular, em uma interação envolvendo o receptor de superfície celular Glut-1, um transportador ubiquitário de glicose (Manel, Kim et al. 2003). Após esta interação, a proteína transmembrana, gp21, promove a fusão do envelope viral com a membrana celular. Em seguida, ocorre a liberação do genoma viral no interior da célula e a fita simples de RNA viral é transcrita reversamente a um DNA de fita dupla, pela transcriptase reversa. Após a síntese, a fita de DNA viral é transportada para o núcleo e inserida em locais inespecíficos no DNA celular, pela proteína viral integrase (Seiki, Eddy et al. 1984). O provirus utiliza a maquinaria celular para codificar proteínas estruturais, enzimas e proteínas regulatórias.

A região *gag*, depois de transcrita, é traduzida nas proteínas do core. As enzimas virais são codificadas por uma região que compreende parte da extremidade 3'da região *gag* e parte da extremidade 5'da região *pol*, gerando um precursor *gag-pol*. A região *env* codifica as proteínas precursoras das proteínas do envelope, que são posteriormente modificadas e glicosiladas.

A região pX codifica as proteínas regulatórias Tax (p40) e Rex (p27). Além de ativar a transcrição de genes virais, a proteína Tax também induz a expressão de muitos genes celulares, como o da interleucina 2 (IL-2) e a cadeia alfa do seu receptor (IL-2R α), fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF), e fator de necrose tumoral (TNF- α), entre outros (Sodroski 1992; Suzuki, Hirai et al. 1995; Azran, Schavinsky-Khrapunsky et al. 2004). A proteína Rex é responsável pela regulação pós-transcricional, regulando o splicing do RNA mensageiro viral (mRNA) (Yoshida, Inoue et al. 1989; Azran, Schavinsky-Khrapunsky et al. 2004).

A proteína Tax tem sido implicada no mecanismo de proliferação de linfócitos em pacientes infectados pelo HTLV-I. Esta proteína é o principal fator transativador do vírus que, através das vias associadas ao CREB/ATF, SRF e NF- κ B, atua indiretamente na indução da transcrição do genoma viral (LTR) e de diversos genes celulares, como citado anteriormente, além de protooncogenes como c-Fos, c-Jun, entre outros (Azran et al., 2004). Tax pode estimular a mitose

ativando as ciclinas D (CDK4 e CDK6), inibir proteínas regulatórias do ciclo celular (p15, p16, p53, pRb), suprimir a apoptose pelo aumento de Bcl-2 e influenciar na proliferação celular pela expressão de fatores de crescimento, como IL-2 e seu receptor (Suzuki, Uchida-Toita et al. 1999; Azran, Schavinsky-Khrapunsky et al. 2004).

A transmissão do HTLV-1 ocorre por contato sexual (Kajiyama, Kashiwagi et al. 1986; Kaplan, Litchfield et al. 1991); por via parenteral: através de transfusão sanguínea e de hemoderivados (Kaplan, Litchfield et al. 1991; Manns, Murphy et al. 1991; Manns, Wilks et al. 1992), e compartilhamento de agulhas contaminadas (Blejer, Saguier et al. 1995; Dourado, Andrade et al. 1998); e por transmissão vertical, principalmente através da amamentação (Saji, Tokugawa et al. 1989; Saito, Ando et al. 1990; Furnia, Lal et al. 1999).

A transmissão sexual é quatro vezes mais eficiente do homem para a mulher (Stuver, Tachibana et al. 1993). 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, Tachibana et al. 1993; Stuver and Mueller 1995).

A transmissão de componentes celulares é o modo mais eficiente de transmissão do vírus, com taxa de 40-60% de soroconversão para o indivíduo receptor (Okochi and Sato 1984; Manns, Wilks et al. 1992). A transmissão sanguínea parece também levar mais rapidamente ao desenvolvimento de HAM/TSP (Osame, Izumo et al. 1986; Sullivan, Williams et al. 1991).

A eficiência da transmissão pelo aleitamento depende da duração da amamentação (Takezaki, Tajima et al. 1997). A taxa de transmissão pela amamentação, em um período superior a 6 meses, é estimada em 18-30% (Furnia, Lal et al. 1999). Outros fatores, como ruptura prolongada da bolsa durante o parto, altos títulos de anticorpos para o HTLV-I, e baixas condições socioeconômicas da mãe podem influenciar na chance da transmissão vertical (Wiktor, Pate et al. 1997).

Estima-se em 10-20 milhões o número de pessoas infectadas pelo HTLV-1 no mundo (Edlich, Arnette et al. 2000). Uma das características da infecção é a maior frequência em agrupamentos étnicos/populacionais, em áreas geográficas definidas. A soroprevalência para o HTLV-1 aumenta com a idade e é mais elevada em mulheres (Mueller 1991). A infecção é endêmica no Japão, Caribe, Melanésia, região central e oeste da África, e América do Sul (Mueller 1991; Dourado, Andrade et al. 1998). Alguns estudos de base populacional mostraram uma soroprevalência de 3-6% em algumas ilhas do Caribe (Blattner, Saxinger et al. 1990; Maloney, Murphy et al. 1991), 9.8% em Kagoshima (Matsuzaki, Otose et al. 1993), e 27% em Miyazaki, no Japão (Mueller, Okayama et al. 1996).

No Brasil, a infecção pelo HTLV-1 foi primeiramente descrita entre imigrantes japoneses e seus descendentes, na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (Kitagawa, Fujishita et al. 1986). Em 1995, uma prevalência de 0,9% desta infecção foi demonstrada em gestantes de baixa renda em Salvador, Bahia (dos Santos, Lopes et al. 1995). Em seguida, uma prevalência de 0,45% foi estimada entre doadores de sangue, em um estudo multicêntrico em cinco capitais brasileiras. As taxas de infecção variavam segundo a região, sendo Salvador-Bahia, a cidade de maior prevalência (1,35%) (Gaivão-Castro et al., 1997). Posteriormente, outros estudos confirmaram a elevada frequência deste vírus em nossa cidade. Em usuários de drogas intravenosas em Salvador, a taxa de infecção em homens foi de 22%, e entre as mulheres, 46,2% (Andrade, Dourado et al. 1998; Dourado, Andrade et al. 1998). Recentemente, um estudo de base populacional reafirma a elevada prevalência do HTLV-1 em Salvador (1,76%, 23/1385), estimando em 40.000 o número de indivíduos infectados. Entre as mulheres, a prevalência atinge 9,3%, em maiores de 50 anos (Dourado, Alcantara et al. 2003).

1.2.1 Alterações imunes na infecção pelo HTLV-1

Como descrito anteriormente, o HTLV-1 tem tropismo preferencial pelos linfócitos T CD4+. A incorporação do vírus ao genoma das células-alvo pode resultar na infecção de cerca de 10% das células circulantes (Richardson, Edwards et al. 1990). Entretanto, a expressão de proteínas virais em PBMCs não cultivados é baixa ou indetectável (Moritoyo, Izumo et al. 1999). Linfócitos T CD4+ recém-isolados de indivíduos infectados expressam espontaneamente Tax e proteínas do core apenas 12 h após incubação (Hanon, Asquith et al., 2000).

Na fase crônica da infecção pelo HTLV-1, a maioria dos indivíduos desenvolve uma forte resposta imune celular contra o vírus. Esta resposta pode ser benéfica, destruindo células infectadas pelo vírus, mas pode igualmente contribuir para o dano tecidual resultante da resposta inflamatória. Frequências elevadas de linfócitos T CD8+ específicos e de linfócitos T CD4+ infectados, sugerem um escape destas células à resposta citotóxica. Os CTLs estão cronicamente ativados em resposta ao vírus e a proteína Tax é o alvo dominante da ação destes linfócitos (Jacobson, Shida et al. 1990; Kannagi, Harada et al. 1991; Parker, Daenke et al. 1992). Elevadas taxas de CTLs específicos para o HTLV-1 no sangue periférico, no líquido, e na medula de pacientes com HAM/TSP, e a ausência de forte resposta CTL específica, especialmente CTLs anti-Tax, em indivíduos assintomáticos, reforçam a ideia da contribuição destes linfócitos na patogênese da HAM/TSP (Biddison, Kubota et al. 1997; Barmak, Harhaj et al. 2003; Elovaara, Koenig et al. 1993). Por outro lado, outros autores sugerem que os CTLs podem ter um papel fundamental na redução da carga proviral do HTLV-1, diminuindo assim o risco de desenvolvimento de doenças inflamatórias, como HAM/TSP (Hanon, Hall et al. 2000). Uma resposta CTL eficiente, *in vivo*, poderia suprimir a frequência de células que expressam Tax, na circulação (Bangham 2003). Os indivíduos com HLA*A2 e Cw*08 parecem ter uma resposta CTL mais

eficiente, menor carga proviral e menor risco de desenvolver HAM/TSP (Jeffery, Usuku et al. 1999; Jeffery, Siddiqui et al. 2000).

Na infecção pelo HTLV-1, as células infectadas sofrem desregulação do ciclo celular, resistência a apoptose e indução autócrina e parácrina da secreção de IL-2 e seu receptor IL-2R, bem como aumento na secreção de outras citocinas (Copeland, Haaksma et al. 1994; Azran, Schavinsky-Khrapunsky et al. 2004). Estas alterações são mediadas primariamente pela ação transativadora da proteína Tax, como descrito anteriormente (Azran, Schavinsky-Khrapunsky et al. 2004). A ativação celular, o aumento da produção de citocinas e a proliferação espontânea são alterações imunológicas classicamente descritas na infecção pelo HTLV-1.

Os linfócitos T de indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam um aumento na expressão de moléculas de ativação como CD25 e HLA-DR, alterações na expressão de moléculas co-estimulatórias, como CD28, bem como de moléculas envolvidas na adesão e migração celular para os sítios inflamatórios (Popovic, Flomenberg et al. 1984; Romero, Prevost et al. 2000). As células T CD4+ infectadas pelo HTLV-1 podem influenciar a ativação do sistema imune de várias maneiras. As células tornam-se ativadas pela ação da proteína Tax que interfere nas vias de sinalização e regulação transcricional (Azran, Schavinsky-Khrapunsky et al. 2004), podendo ativar células não infectadas de maneira antígeno-independente (via moléculas de adesão CD58-CD2). A ativação do sistema imune dá-se também pela atividade antiviral dos linfócitos T CD8+ em reconhecimento a epítopos virais no contexto do complexo principal de histocompatibilidade de classe I (MHC-classe I). Além disso, células apresentadoras de antígeno (APC) podem ativar o sistema imune pela apresentação de peptídeos virais via MHC-classe II (Hollberg 1999).

Concentrações elevadas de citocinas como IL-2, fator de necrose tumoral (TNF)- α , interferon (IFN)- γ , IL-6, IL-10, entre outras, têm sido relatadas tanto em pacientes com HAM/TSP, quanto em indivíduos assintomáticos (Jacobson, Shida et al. 1990; Nishiura, Nakamura et al. 1996; Biddison, Kubota et al. 1997; Carvalho, Bacellar et al. 2001). Outros estudos apontam para uma maior produção

destas citocinas em pacientes com HAM/TSP (Nakamura, Furuya et al., 2000) (Goon, Igakura et al. 2003; Santos, Porto et al. 2004). A associação entre a produção de citocinas e manifestação clínica não está completamente esclarecida. Um aumento da expressão do mRNA de TNF- α e IFN- γ , em indivíduos com HAM/TSP ou assintomáticos, foi associado a um aumento da carga proviral (Watanabe, Nakamura et al. 1995). Um outro estudo, avaliando indivíduos infectados com cargas provirais semelhantes, demonstrou uma produção de IFN- γ e TNF- α significativamente maior em pacientes com mielopatia, sugerindo que a produção destas citocinas contribua para o desenvolvimento da HAM/TSP (Furukawa, Saito et al. 2003). Entre os assintomáticos, um grupo de indivíduos que produzem níveis elevados de IFN- γ , comparáveis aos observados em pacientes com HAM/TSP, têm sido descrito (Carvalho, Bacellar et al. 2001; Santos, Porto et al. 2004).

A proliferação espontânea, relatada na literatura desde o início dos anos 80 (Popovic et al., 1983 e 84), é definida como a capacidade de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de proliferarem *ex vivo* na ausência de antígeno ou de suplementação de citocinas como IL-2 (Kramer, Jacobson et al. 1989). Esta alteração consiste principalmente na proliferação dos linfócitos T CD4+ infectados pelo HTLV-1 (Sakai, Nagai et al. 2001).

Altos níveis de proliferação foram descritos em indivíduos com títulos elevados de anticorpos, sugerindo uma correlação entre proliferação espontânea e uma forte resposta imune (Prince, Lee et al. 1991). O provirus tem sido detectado em linfócitos T CD4+ de memória, indicando que o HTLV-1 promove especialmente a proliferação desta subpopulação de linfócitos (Richardson, Edwards et al. 1990; Prince, York et al. 1995). Este fenômeno tem sido descrito tanto em pacientes com HAM/TSP, quanto em indivíduos assintomáticos (Kramer, Jacobson et al. 1989; Lunardi-Iskandar, Gessain et al. 1993). Vários autores têm demonstrado níveis mais elevados de proliferação entre pacientes com HAM/TSP (Itoyama, Minato et al. 1988; Matsumoto, Sugimoto et al. 1990). Entretanto, alguns indivíduos assintomáticos apresentam proliferação em níveis semelhantes aos pacientes com HAM/TSP (Kramer, Jacobson et al. 1989; Santos, Porto et al.

2004). A proliferação espontânea é descrita em cerca de 50% dos indivíduos infectados assintomáticos (Prince, Lee et al. 1991).

A grande maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanece assintomática. Apenas cerca de 5-10% desenvolverão as patologias clássicas associadas ao HTLV-1, como ATLL ou HAM/TSP (Uchiyama, Yodoi et al. 1977; Hallsberg and Hafler 1993). Não está claro porque apenas alguns indivíduos desenvolvem ATL, HAM/TSP ou outras doenças inflamatórias. A resposta imune, como descrita anteriormente, o polimorfismo genético do indivíduo infectado e a carga proviral são descritos como fatores que podem influenciar o desfecho da infecção (Sonoda, Fujiyoshi et al. 1996; Jeffery, Usuku et al. 1999; Jeffery, Siddiqui et al. 2000).

A carga proviral e o polimorfismo genético do indivíduo infectado podem exercer influência importante na patogênese da infecção. A carga proviral parece ser mantida, principalmente, pela proliferação de células contendo provirus (Cavrois, Gessain et al. 1996; Eiraku, Hingorani et al. 1998). A transcrição viral é mais elevada em linfócitos T CD4+ do que em linfócitos T CD8+ (Newbound, Andrews et al. 1996). Entre os pacientes com HAM/TSP, uma maior carga proviral tem sido relatada, comparada aos indivíduos assintomáticos (Vernant, Maurs et al. 1987; Yoshida, Inoue et al. 1989; Gessain, Saal et al. 1990; Olindo, Lezin et al. 2005). Um aumento na carga proviral tem sido igualmente relatado em indivíduos infectados com outras manifestações clínicas, como artrite, uveíte e acometimento pulmonar (Sugimoto, Mita et al., 1993) (Yakova, Lezin et al. 2005). Uma comparação da carga proviral entre pacientes com HAM/TSP e assintomáticos geneticamente relacionados ou não aos pacientes com HAM/TSP, revelou uma carga proviral mais elevada nos pacientes com HAM/TSP. Entretanto, a carga proviral dos assintomáticos geneticamente relacionados aos pacientes com HAM/TSP também foi elevada, sugerindo a existência de fatores genéticos implicados na replicação do vírus (Nagai, Usuku et al. 1998). Estudos realizados no Japão apontam para uma possível associação entre o desenvolvimento de

HAM/TSP e ATLL, e um tipo determinado de antígeno leucocitário humano (HLA). Sonoda e colaboradores demonstraram que os haplótipos associados à ATLL têm alelos DRB1-DQB1 correlacionados à uma baixa resposta imune contra o HTLV-1, enquanto os haplótipos de pacientes com diagnóstico de HAM/TSP têm alelos DRB1-DQB1 diferentes, e associados à uma resposta imune intensa (Sonoda, Fujiyoshi et al. 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, Usuku et al. 1999; Jeffery, Siddiqui et al. 2000). Uma forte resposta CTL contra o HTLV-1, restrita ao MHC-classe I, reduz a carga proviral e diminui o risco de desenvolvimento de doença (Jeffery, Usuku et al. 1999; Jeffery, Siddiqui et al. 2000).

Assim como o HIV-1, o HTLV-1 infecta preferencialmente linfócitos T CD4+, resultando em uma infecção de longo período de latência. Entretanto, enquanto o HIV induz uma imunossupressão grave, com alterações qualitativas e destruição dos linfócitos T CD4+ (Clerici, Stocks et al. 1989), o HTLV-1 leva a uma proliferação espontânea destes linfócitos T, como descrito anteriormente. A proliferação espontânea, que envolve preferencialmente linfócitos T CD4+CD45RO+, e a ativação celular, poderiam implicar em algum grau de disfunção imune, causando imunossupressão. De fato, os linfócitos T CD4+CD45RO+ são os responsáveis pela resposta aos antígenos de memória.

Em casos de ATLL, a imunossupressão está bem documentada, com ocorrências de infecções bacterianas e oportunistas, como pneumonia por *Pneumocystis carinii*, infecções fúngicas e strongiloidíase (Tashiro, Yamasaki et al., 1992 Int). Entretanto, estudos clínicos e epidemiológicos apontam para um risco maior de co-infecções com diversos agentes infecciosos, sugerindo assim algum grau de imunossupressão nos indivíduos infectados, mesmo na ausência de malignidade (Marsh 1996).

Os indivíduos infectados pelo HTLV-1 parecem ter um risco mais elevado de desenvolver tuberculose. Alguns estudos realizados no Japão demonstraram

uma redução na frequência de respondedores ao teste intradérmico da tuberculina (PPD), bem como a redução no tamanho da endureção, nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 (Tachibana, Okayama et al. 1988; Murai, Tachibana et al. 1990; Welles, Tachibana et al. 1994). Estes estudos sugerem alterações funcionais nas populações celulares envolvidas na hipersensibilidade tipo tardia, com uma imunossupressão subclínica nos portadores do HTLV-1, a qual aumenta com a idade. Para determinar o mecanismo de hiporesponsividade ao PPD nos indivíduos infectados pelo HTLV-1, Suzuki e colaboradores avaliaram, *in vitro*, a produção de citocinas em resposta ao PPD em PBMC de indivíduos infectados ou não pelo HTLV-1. A resposta, *in vivo*, ao PPD foi paralelamente avaliada. Houve uma menor proliferação celular e produção de IFN- γ em resposta ao PPD, entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1 não-respondedores ao teste intradérmico ao PPD, do que nos indivíduos não infectados pelo HTLV-1. Por outro lado, a adição de IL-12 e de anticorpos anti-IL4 não restaurou, *in vitro*, a resposta dos indivíduos infectados não respondedores (Suzuki, Dezzutti et al. 1999). Estes dados indicam que a anergia ao PPD em indivíduos infectados pelo HTLV-1 pode ocorrer por uma menor resposta a IL-12.

Outros estudos, realizados no Brasil, demonstraram igualmente uma maior ocorrência de tuberculose em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Cerca de 11% dos pacientes hospitalizados com tuberculose, em um hospital na cidade de Salvador, estavam infectados pelo HTLV-1 (Moreira, Ribeiro et al. 1993). Além disso, parece haver uma maior letalidade da tuberculose na co-infecção HTLV-1/*Mycobacterium tuberculosis* (33%), comparada à tuberculose isolada (13%) (Pedral-Sampaio, Martins Netto et al. 1997). Recentemente, um estudo caso-controlado, realizado nesta mesma cidade, demonstrou um risco três vezes maior para o desenvolvimento de tuberculose em indivíduos infectados pelo HTLV-1 (Marinho, Galvao-Castro et al. 2005).

A hanseníase, uma outra micobacteriose, também é descrita com uma maior frequência em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Um aumento no risco da infecção pelo HTLV-1 em pacientes com hanseníase, comparado com indivíduos saudáveis, foi descrito (5.6% vs. 1.9%, respectivamente, no Congo, e 5.7% vs. 1.5%,

respectivamente, na Costa do Marfim) (Verdier, Denis et al. 1990). Populações vivendo com hanseníase em dois sanatórios no Japão demonstraram uma prevalência de infecção pelo HTLV-1 de cerca de 8% (Muneishi, Tagushi et al., 1998). Em um pequeno estudo no Zaire, Kashala e colaboradores encontraram uma prevalência de 8.8% para HTLV-1 entre os pacientes com hanseníase (Kashala, Marlink et al. 1994).

A coinfeção entre HTLV-I e *Strongyloides stercoralis* tem sido amplamente relatada. No Japão, vários estudos documentaram que o risco de infecção ativa com *S. stercoralis* é significativamente elevado em indivíduos com sorologia positiva para HTLV-1, comparado aos indivíduos não infectados (Nakada, Kohakura et al. 1984; Sato and Shiroma 1989). Na Jamaica, estudos baseados em pesquisa de *S. stercoralis* nas fezes de indivíduos infectados com o HTLV-1, também mostraram associação entre HTLV-1 e este helminto (Robinson, Lindo et al. 1994). A coinfeção HTLV-1/*S. stercoralis* e a apresentação de formas graves e disseminadas da estrangiloidíase tem sido documentada em várias partes do mundo, inclusive no Brasil (Newton, Limpuangthip et al. 1992; Sato, Shiroma et al. 1994; Porto, Muniz et al. 2002). Estudos que avaliam o perfil de citocinas envolvidas na resposta imune nesta coinfeção apontam para uma diminuição de citocinas do tipo Th2 (Porto, Neva et al. 2001) em decorrência ao aumento da secreção de citocinas do tipo Th1, especialmente IFN- γ . Com a diminuição das citocinas tipo Th2 na infecção pelo HTLV-1, o indivíduo apresentaria um comprometimento da resposta imune contra o parasito, possibilitando assim a ocorrência de formas graves de estrangiloidíase (Porto, Neva et al. 2001; Porto, Santos et al. 2005).

A escabiose também tem sido relatada em pacientes infectados pelo HTLV-1 com elevada frequência (Takeshita and Takeshita 2000; Brites, Weyll et al. 2002; Blas, Bravo et al. 2005). Um estudo, realizado em Salvador-Bahia, avaliou o impacto de infecções por retrovirus na apresentação clínica da escabiose, revelando uma elevada prevalência (32%) de infecção pelo HTLV-1 nestes pacientes (Brites, Weyll et al. 2002).

As evidências de aumento de morbidade e mortalidade nas infecções acima citadas em indivíduos infectados pelo HTLV-I sugerem que estes indivíduos possam apresentar uma disfunção imune clinicamente importante. A avaliação da resposta dos linfócitos T CD4+, particularmente a avaliação, *ex vivo*, da resposta aos antígenos de memória poderia contribuir para a compreensão dos mecanismos dessa disfunção.

Ainda não foi estabelecido um consenso para o tratamento das doenças causadas pelo HTLV-1. Considerando a pequena possibilidade de desenvolvimento de doença a partir da infecção pelo HTLV-1, os indivíduos assintomáticos normalmente não são tratados. Por outro lado, os pacientes com diagnóstico de entidades clínicas relacionadas à infecção precisam ser tratados.

Os critérios de tratamento variam entre os serviços assistenciais. Não existe um tratamento comprovadamente efetivo, e diferentes drogas, com distintas formas de administração, já foram testadas. O uso de corticosteróides, como prednisolona e IFN- α têm sido aplicados em pacientes com doenças inflamatórias, especialmente HAM/TSP (Osame 1990; Yamasaki, Kira et al. 1997).

Em 2004, Osame e colaboradores avaliaram as alterações fenotípicas das células T após terapia com IFN- α em pacientes com HAM/TSP e demonstraram uma diminuição na carga proviral e 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, Nakagawa et al. 2004).

A quimioterapia, usualmente aplicada para os linfomas não-Hodgkin, não tem mostrado sucesso no tratamento da ATLL. O uso combinado de antiretroviral, como a zidovudina, associado ao IFN- α , tem mostrado alguma atividade, (Bazarbachi and Hermine 1996; Matutes, Taylor et al. 2001), mas a toxicidade e elevado custo limitam seu uso.

A identificação de novas drogas é de fundamental importância, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a infecção é endêmica.

Fournet e colaboradores têm demonstrado que compostos quinolínicos são capazes de diminuir a proliferação espontânea em células de linhagem transformadas pelo HTLV-I (Fournet, Mahieux et al. 2003). As quinolinas são alcalóides extraídos de uma planta boliviana, com propriedades medicinais, a *Galipea longiflora* (Fournet, Barrios et al. 1993). Após a extração e identificação, as quinolinas foram produzidas sinteticamente (Fakhfakh, Fournet et al. 2003).

Os compostos quinilínicos têm demonstrado atividade *in vitro* em outras situações, como no tratamento experimental da leishmaniose cutânea (Fournet, Ferreira et al. 1996), e das infecções pelo *Plasmodium vinckei petteri* (Gantier, Fournet et al. 1996) e pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos (Nakayama, Ferreira et al. 2001). Além disso, estes compostos agem inibindo a atividade da enzima integrase do HIV-1 (Mekouar, Mouscadet et al. 1998; Zouhiri, Mouscadet et al. 2000).

2. Objetivos

Objetivos e apresentação do trabalho

Na primeira parte deste estudo realizamos uma avaliação da imunidade celular em indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1. Inicialmente quantificamos as populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, e subpopulações de linfócitos T de memória, CD4⁺CD45RO⁺, e T CD4⁺CD45RA⁺, virgens, no sangue total. Em seguida, avaliamos a resposta aos antígenos de memória através de um ensaio clássico de linfoproliferação e o repertório do TCR-V β da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ por citometria de fluxo.

Em seguida, avaliamos o perfil de ativação celular e a secreção de IFN- γ pelos linfócitos T de indivíduos infectados pelo HTLV-1, na presença ou não de proliferação, com o objetivo de compreender fatores determinantes da proliferação espontânea e hiporesponsividade aos antígenos de memória. Neste estudo, avaliamos a frequência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando as moléculas CD25, CD28, CD62L, CD69 e HLA-DR, bem como a proporção de linfócitos T produtores de IFN- γ nestas células, por citometria de fluxo

Na etapa final deste trabalho, testamos o potencial inibitório de compostos quinolínicos na proliferação celular de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1, uma vez que estes compostos foram descritos como capazes de diminuir a proliferação espontânea em linhagens celulares transformadas pelo HTLV-1 (Fournet, Mahieux et al. 2003). Para realizar este trabalho, determinamos a toxicidade dos compostos quinolínicos em PBMC de indivíduos não infectados. As drogas não tóxicas foram então testadas em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com proliferação espontânea. Paralelamente, a toxicidade dos compostos foi avaliada em PBMC de indivíduos infectados.

3. Capítulo II

Peripheral blood mononuclear cells from individuals infected with Human T-cell Lymphotropic Virus type-I (HTLV-I) have a reduced capacity to respond to recall antigens.

Rita Elizabeth MASCARENHAS; Cláudia BRODSKYN, Geisa BARBOSA, Jorge CLARÊNCIO; Antônio Souza ANDRADE-FILHO; Frederico FIGUEIROA; Bernardo GALVÃO-CASTRO & Fernanda GRASSI

CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, May 2006

O nosso objetivo foi estudar a resposta imune celular de indivíduos infectados pelo HTLV-I, apresentando ou não proliferação espontânea, frente aos antígenos de memória candidina, citomegalovirus, tuberculina, e toxóide tetânico.

Inicialmente, verificamos a capacidade de proliferação de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 na ausência de estímulo. Observamos proliferaçõespontânea em 39 de 58 (67%) dos indivíduos infectados. Em seguida, nós determinamos as freqüências das populações de linfócitos T CD4+ e T CD8+, bem como as subpopulações de linfócitos T CD4+CD45RO+ e T CD4+CD45RA+ no sangue periférico de 29 indivíduos infectados pelo HTLV-1 (19 com proliferação e 10 sem proliferação) e de 10 indivíduos não infectados. Encontramos um aumento significativo na freqüência de linfócitos T CD4+CD45RO+ nos indivíduos com proliferação espontânea quando comparados com aqueles sem proliferação espontânea e aos controles não infectados.

Ao avaliarmos a resposta proliferativa aos antígenos de memória, observamos uma redução de resposta positiva entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1 com e sem proliferação espontânea, quando comparados aos controles não infectados. Além disso, os indivíduos infectados respondem a um número

menor de antígenos que os controles. Enquanto 83% dos indivíduos não infectados respondem a três ou mais antígenos, apenas 33% indivíduos infectados sem proliferação espontânea são capazes de reconhecer três ou quatro antígenos ($p=0.038$). Entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1 com proliferação, a maioria não responde a nenhum antígeno.

Através da avaliação do repertório do TCR-V β , observamos uma expansão policlonal nos linfócitos T CD4⁺ dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 com proliferação espontânea. Os indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem proliferação espontânea apresentam o repertório TCR-V β em linfócitos T CD4⁺ similar aos controles não infectados.

Estes resultados sugerem que os indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam uma imunossupressão, como demonstrada pela diminuição no índice de estimulação aos antígenos de memória, mesmo na ausência de proliferação espontânea.

Peripheral Blood Mononuclear Cells from Individuals Infected with Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Have a Reduced Capacity To Respond to Recall Antigens

Rita Elizabeth Mascarenhas,^{1,4} Cláudia Brodskyn,² Geisa Barbosa,^{1,4} Jorge Clarêncio,²
Antônio Souza Andrade-Filho,^{3,4} Frederico Figueiroa,^{3,4} Bernardo Galvão-Castro,^{1,4}
and Fernanda Grassi^{1,4*}

Advanced Laboratory of Public Health/Gonçalo Moniz Research Center (CPqGM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil¹; Microbiology and Immunoregulation of Integrate Laboratory/Gonçalo Moniz Research Center (CPqGM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil²; Neurology and Neurosurgery Foundation, Salvador, Bahia, Brazil³; and Bahiana School of Medicine and Public Health, Salvador, Bahia, Brazil⁴

Received 12 July 2005/Returned for modification 11 August 2005/Accepted 16 March 2006

Evidence indicates that human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection leads to chronic immunosuppression and a greater susceptibility to infectious diseases. Spontaneous in vitro proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) is an important immunological feature of HTLV-1-infected individuals. However, the association between spontaneous proliferation and immunosuppression is not clear. In this study, we evaluated the cellular immune responses of PBMC from 58 asymptomatic HTLV-1-infected individuals with PBMC showing or not showing spontaneous proliferation. Individuals with PBMC that spontaneously proliferated had increased proportions of CD4 T cells expressing CD45RO and dramatically reduced responses to recall antigens. In addition, frequencies of positive responses to recall antigens were also decreased in HTLV-1-infected individuals without spontaneous proliferation of PBMC. There was a polyclonal expansion of multiple T-cell receptor V β families of CD4⁺ T lymphocytes in patients with spontaneous proliferation. We observed that HTLV-1 induced an immunosuppression characterized by a decrease in the stimulation index to a recall antigen, even in individuals who did not present spontaneous proliferation. On the other hand, only patients with PBMC presenting spontaneous proliferation showed polyclonal activation and increased proportion of CD4 T cells expressing CD45RO.

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a human retrovirus that has infected 10 to 20 million people worldwide (3). There are areas in Japan, the Caribbean, Melanesia, central and western Africa, and South America that are large endemic foci (17, 35). In Brazil, the overall prevalence of HTLV-1 infection in blood donors is 0.45%, and the city of Salvador (located in the northeast) has the highest prevalence (1.35%) in the country (4). Recently, a population-based cross-sectional study performed in Salvador, Brazil, found an HTLV-1 seroprevalence of 1.76% (2).

Two diseases are clearly associated with HTLV-1 infection: adult T-cell leukemia/lymphoma (6, 26, 34) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (5, 24). Although 95% of infected people remain asymptomatic (7), there is evidence that HTLV-1 has a much broader spectrum of disease manifestations, such as uveitis (20), arthritis (8, 12), polymyositis (22), lymphocytic interstitial pneumonia (31), and infective dermatitis in children (15). Severe immunosuppression is well documented in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma (10, 19). However, a growing body of literature suggests that many HTLV-1-infected individuals show chronic immunosuppression, even in the absence of malignant disease. HTLV-1-infected individuals are more susceptible to several

infectious diseases, such as strongyloidiasis (1, 30), Hansen's disease (11), and tuberculosis (21, 25). In addition, they have reduced cutaneous delayed-type hypersensitivity responses to purified protein derivative (PPD) of *Mycobacterium tuberculosis* (14, 23, 33, 36).

The immunologic hallmark of HTLV-1-infected individuals is a spontaneous in vitro proliferation of their peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (without any added antigen) observed in approximately fifty percent of patients (13, 27, 29). The memory CD4⁺ CD45RO⁺ subset is the principal T-cell population involved in this phenomenon (29). In this study, we evaluated the cellular immune responses of HTLV-1-infected individuals (with or without PBMC spontaneous proliferation) against candidin, cytomegalovirus (CMV), PPD, and tetanus toxoid (TT) recall antigens.

We observed that HTLV-1-infected individuals had reduced stimulation indexes to recall antigens, even when their PBMC did not spontaneously proliferate. On the other hand, only the individuals with spontaneous PBMC proliferation (SP+) had polyclonal T-cell activation (as shown by the study of T-cell receptor V β [TCR-V β] families) and an increase in the proportion of CD4 T cells expressing CD45RO.

MATERIALS AND METHODS

Patients. Fifty-eight asymptomatic HTLV-1-infected individuals studied at the HTLV-1 Reference Development of Science Foundation (Salvador, Bahia, Brazil) were included in the study. The group consisted of 47 women (81%) and 11 men (19%) and had a mean age of 43 years. Blood samples from 12 healthy

* Corresponding author. Mailing address: LASP/CPqGM/FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, no. 121, Candeal, Salvador, Bahia CEP 40296-710, Brazil. Phone: 55 71-3356 8822. Fax: 55 71-3356 4320, ext. 300. E-mail: grassi@cpqgm.fiocruz.br.

TABLE 1. Spontaneous proliferation of PBMC from HTLV-1-infected individuals^a

PBMC	No. of HTLV-1-infected individuals	Mean cpm \pm SD (range)
SP+	39	1,656 \pm 956 (520–4,629)
SP-	19	217 \pm 152 (18–476)
Total	58	

^a The mean counts per minute of nonstimulated PBMC from uninfected controls was 159 \pm 138 cpm (range, 6 to 462 cpm). For HTLV-1-infected individuals, the mean cpm from nonstimulated cells was \geq 500 cpm at day 6 for individuals with SP+ PBMC, while it was \leq 500 cpm at day 6 for HTLV-1-infected individuals with SP- PBMC.

individuals from the Bahia State Blood Bank (HEMOBA) were used as controls. All samples were screened for HTLV-1/2 antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Ab-Capture ELISA test system; Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, New Jersey), and results were confirmed by Western blot assay (HTLV Blot 2.4; Genelabs Technologies, Singapore). Informed consent was obtained from all enrolled patients, and the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) ethics committee approved this study.

Media and reagents. RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was supplemented with 2 mM L-glutamine, 1% nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and pooled human AB serum (10%) (Sigma).

Cells. PBMC from HTLV-1-infected individuals and healthy blood donors were obtained from heparinized venous blood samples by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). All experiments were performed with freshly isolated PBMC.

Flow cytometry. For direct labeling, 50- μ l portions of whole-blood samples from HTLV-1-infected individuals and healthy blood donors were incubated with antibodies for 30 min at room temperature. Erythrocytes were subsequently lysed with fluorescence-activated cell sorting (FACS) lysing solution (Becton-Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA). Cells were then washed three times in 2 ml of phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin. After a final wash, cells were fixed in phosphate-buffered saline containing 4% paraformaldehyde. In order to quantify CD4 and CD8 T cells, the following monoclonal antibodies were used: fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD3 (Immunotech, a Beckman Coulter Company), phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD4 (BD Pharmingen Technical), and phycoerythrin-cyanin-labeled anti-CD8 (Immunotech). To analyze CD4 T-cell memory and naive subsets, cells were stained with phycoerythrin-cyanin CD4, PE-labeled CD45RO, and FITC-labeled CD45RA (Immunotech). We studied TCR-V β repertoires in five HTLV-1-infected individuals with PBMC with spontaneous proliferation and five HTLV-1-infected individuals with PBMC without spontaneous proliferation (SP-). To study TCR-V β family expression on T lymphocytes, cells were analyzed for surface expression of peridinin chlorophyll protein-labeled anti-CD4 (clone RPA-T4; Becton Dickinson), PE-labeled anti-CD8 (clone RPA-T8; Becton Dickinson), and FITC-labeled anti-TCR-V β (clones V β 2 [E22E7.2], V β 3.1 [LE-89], V β 5.1 [IMMU 157], V β 5.2 [36213], V β 6.1 [CRI 304.3], V β 8 [56CS.2], V β 11 [C21], V β 12 [VER2.32.1], V β 13.1 [IMMU 222], V β 13.6 [JU-74], V β 16 [TAMAYA 1.2], V β 17 [E17.5F3.15.13], V β 20 [ELL 1.4], V β 21.3 [IG 125], and V β 22 [IMMU 546]; Immunotech). Analyses were performed using a FACSort and Cell Quest software (Becton Dickinson, Mountain View, Calif.). At least 10⁵ events were analyzed per sample.

Antigen-specific and nonspecific proliferation assays. Antigen-specific and nonspecific proliferation assays were performed with unfractionated PBMC. The PBMC were cultured in RPMI 1640 culture medium with 10% AB serum, using 96-well U-bottom culture plates (Costar, Cambridge, MA) in triplicate at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere for 5 days. Briefly, 10⁵ cells/well were cultured in the presence of purified candidin (25 μ g/ml; Sanofi Pasteur, France), PPD of *Mycobacterium tuberculosis* (2 μ g/ml; Statens Serum Institute, Denmark), and CMV (10 μ g/ml; Behring, Marburg, Germany), all kindly provided by Brigitte Autran, and TT (1 μ g/ml) kindly provided by Daniel Scott, Institut Pasteur, Paris, France. Antigens were dialyzed and frozen prior to use. Controls consisted of supplemented medium. After 5 days of culture, cells were pulsed overnight with 1 μ Ci [³H]thymidine (specific activity, 2 Ci/mmol; ICN, Costa Mesa, CA). Incorporated [³H]thymidine was measured with a liquid scintillation beta counter (matrix 9600 direct beta counter; Packard). Results were expressed as mean counts per minute. The stimulation index represents the ratio of mean

TABLE 2. Percentages of T-cell subsets from HTLV-1-infected individuals and uninfected controls

Group and parameter	% T cells				CD4/CD8 ratio
	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ ^a	CD4 ⁺ CD45RO ⁺ ^b	CD8 ⁺	
Group A (SP+ HTLV-1-infected subjects [n = 19])					
Mean	41	29	79	24	1.7
SD	14	12	10	6	0.7
Median	44	30	79	23	2.0
Range	10–61	10–53	55–92	12–37	1.0–3.0
Group B (SP- HTLV-1-infected subjects [n = 10])					
Mean	43	32	67	21	2.5
SD	9	14	18	10	1.0
Median	45	31	68	19	2.5
Range	26–56	13–56	46–99	10–41	1.0–4.0
Group C (uninfected controls [n = 10])					
Mean	42	37	67	21	2.2
SD	9	11	11	4	0.8
Median	40	37	64	22	2.0
Range	31–55	23–57	51–86	15–30	1.0–4.0
P value ^c					
Group A vs group B	0.84	0.36	0.02	0.20	0.09
vs group C					
Group A vs group B	0.84	0.65	0.04	0.12	0.07
Group A vs group C	0.60	0.15	0.01	0.27	0.18
Group B vs group C	0.65	0.43	0.85	0.31	0.49

^a CD4⁺ cells expressing CD45RA.

^b CD4⁺ cells expressing CD45RO.

^c Differences between the values for SP+ and SP- HTLV-1-infected groups and uninfected controls were compared by the Kruskal-Wallis test (group A versus group B versus group C). Differences between two groups were analyzed by the Mann-Whitney U test (group A versus group B, group A versus group C, and group B versus group C). Differences between the values for SP+ and SP- HTLV-1-infected groups and uninfected controls that were statistically significant are shown in bold type.

counts obtained in the presence of antigen to mean counts obtained without antigen. A stimulation index of \geq 3 indicated a positive proliferative response. Therefore, in this study, a mean counts per minute of \geq 500 for nonstimulated cells (i.e., three times the mean counts per minute for uninfected control nonstimulated cells, namely, 159 \pm 138 cpm; range, 6 to 462) was considered spontaneous proliferation of PBMC.

Statistical analyses. Data are expressed as means and standard deviations. We compared mean values of the percentages of CD4 and CD8 T-cell subsets and stimulation indexes of proliferative responses to recall antigen for the three groups (patients with spontaneous proliferation of PBMC, those without spontaneous proliferation, and controls) using the Kruskal-Wallis test. If a significant difference was found, a Mann-Whitney U test was performed. The statistical analysis of TCR-V β was performed by the Wilcoxon signed-rank test. A P value of less than 0.05 denoted a statistically significant difference. BioEstat 3.0 software (Sociedade Civil Mamiua/MCT-CNPq) was used for all statistical analyses.

RESULTS

PBMC spontaneous proliferation. As shown in Table 1, spontaneous PBMC proliferation was observed in 39 out of 58 (67%) HTLV-1-infected individuals (1,656 cpm \pm 956 cpm; range, 520 to 4,629 cpm).

On the other hand, no spontaneous PBMC proliferation was observed in 19 out of 58 (33%) HTLV-1-infected individuals (217 \pm 152 cpm; range, 18 to 476). In this case, the mean counts per minute for asymptomatic HTLV-1-infected individuals did not differ from the mean counts per minute for unin-

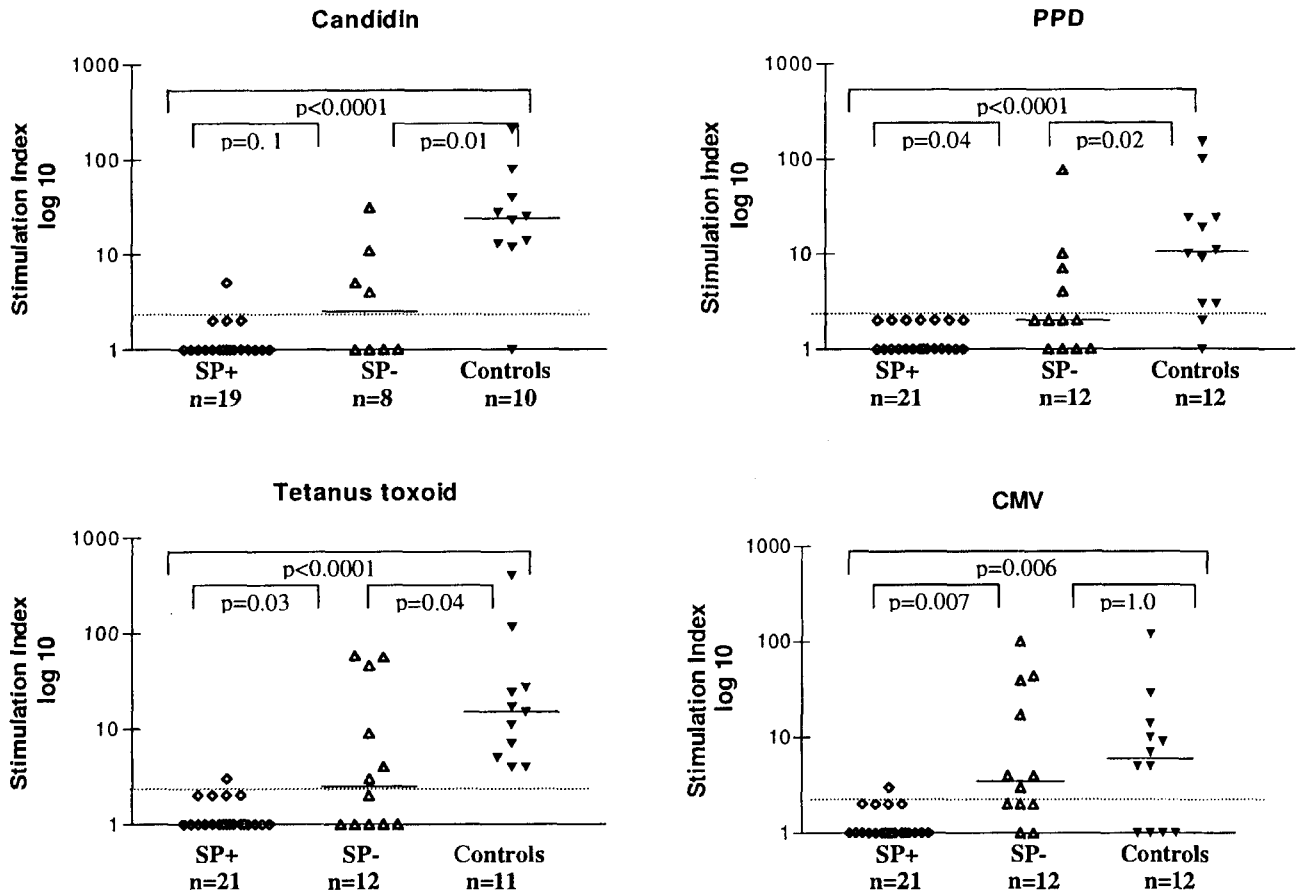


FIG. 1. Proliferative responses to recall antigens from HTLV-1-infected asymptomatic individuals with PBMC with and without spontaneous proliferation, respectively, and uninfected controls. PBMC were cultured in the presence of candidin, PPD, tetanus toxoid, and cytomegalovirus. At day 5 of culture, cells were pulsed overnight with 1 μ Ci [3 H]thymidine. Results are expressed as stimulation indexes (average counts per minute in the presence of antigens/average counts per minute obtained without antigen). Tests were carried out in triplicate. A stimulation index of ≥ 3 was considered positive for proliferative responses (above dashed lines). Bars depict median values. Differences were considered significant when P was <0.05 (Mann-Whitney U test).

infected controls (159 ± 138 cpm; range, 6 to 462) ($P = 0.32$ by the Mann-Whitney U test).

HTLV-1-infected individuals have an expansion of the memory CD4⁺ CD45RO⁺ T-cell subset. As shown in Table 2, the percentage of circulating CD4⁺ T lymphocytes in the HTLV-1-infected group with PBMC with spontaneous proliferation ($41\% \pm 14\%$) was similar to those of HTLV-1-infected individuals without spontaneous PBMC proliferation ($43\% \pm 9\%$) and of uninfected controls ($42\% \pm 9\%$) ($P = 0.84$). However, the memory CD4⁺ CD45RO⁺ T-cell subset was expanded in HTLV-1-infected individuals with spontaneous PBMC proliferation ($79\% \pm 10\%$) compared to that in HTLV-1-infected individuals without spontaneous proliferation ($67\% \pm 18\%$) ($P = 0.04$) and uninfected controls ($67\% \pm 11\%$) ($P = 0.01$). Additionally, the proportion of CD4 T cells expressing CD45RO was positively correlated to spontaneous proliferation of PBMC in culture (Spearman's $r = 0.37$; $P = 0.04$) (data not shown).

There were no significant differences in the frequencies of naive CD4⁺ CD45RA⁺ and CD8⁺ T-cell subsets in HTLV-

infected individuals (with or without spontaneous PBMC proliferation) and in uninfected controls.

PBMC from HTLV-1-infected individuals have a lower capacity to proliferate in response to recall antigens. HTLV-1-infected individuals with spontaneous proliferation showed the lowest stimulation indexes to all antigens tested (candidin, PPD, tetanus toxoid, and cytomegalovirus antigens) compared to HTLV-1-infected individuals without spontaneous proliferation and uninfected controls. Only 5.3% (1 out of 19) responded to candidin, while 4.8% (1 out of 21) responded to CMV or TT (Fig. 1). Besides that, HTLV-1-infected SP- patients also showed decreases in stimulation indexes: 50% of them (4 out of 8) responded to candidin, 33% (4 out of 12) responded to PPD, 42% (5 out of 12) to cytomegalovirus, and 50% (6 out of 12) to tetanus toxoid antigen. Almost all uninfected controls had positive responses to recall antigens: 90% to candidin (9 out of 10), 83% to PPD (10 out of 12), 100% to tuberculin (11 out of 11), and 67% (8 out of 12) to CMV.

In addition, PBMC from HTLV-1-infected individuals re-

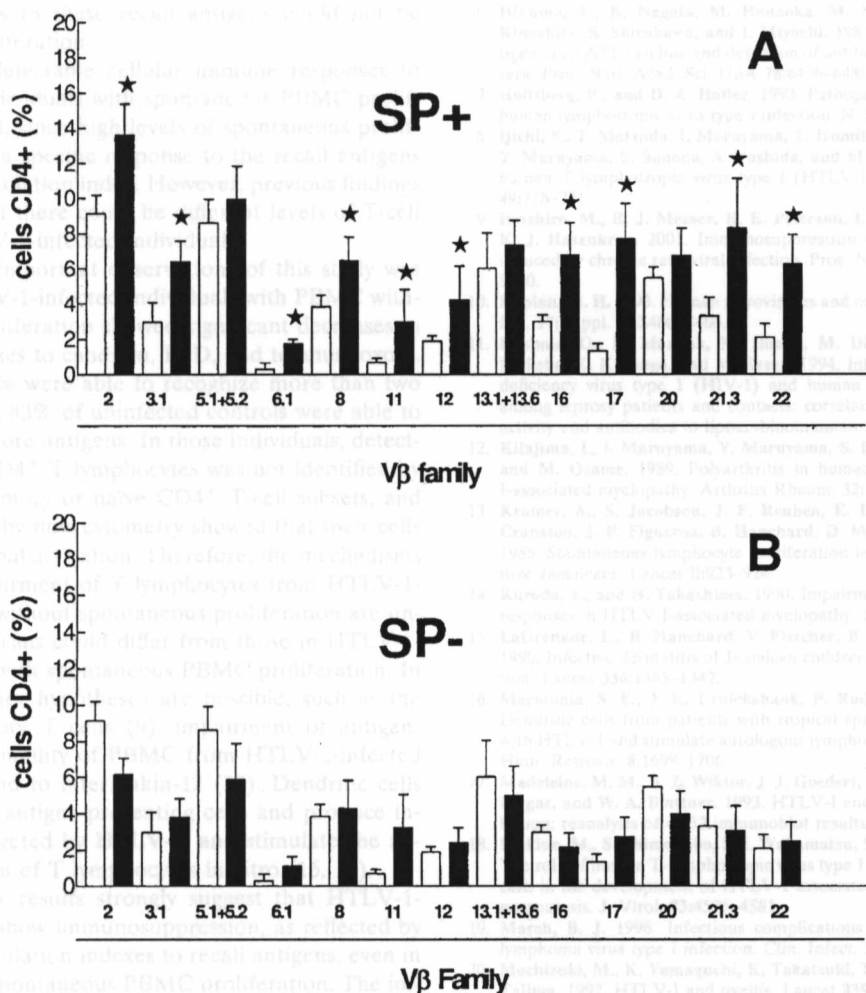


FIG. 2. TCR-V β repertoire from five SP+ and five SP- HTLV-1-infected individuals. A total of 1×10^5 PBMC were analyzed for surface expression of CD4 TCR-V β family repertoire with specific monoclonal antibodies by flow cytometry. Analysis was performed on the FACScan using Cell Quest software. At least 10,000 events were analyzed per sample. Significant differences between uninfected controls and HTLV-1-infected individuals ($P < 0.05$ by the Wilcoxon signed-rank test) are indicated (*). (A) CD4 $^+$ T cells from 5 HTLV-1-infected patients with PBMC exhibiting spontaneous proliferation (black bars) and from 14 uninfected controls (white bars). (B) CD4 $^+$ T cells from 5 HTLV-1-infected patients with PBMC not exhibiting spontaneous proliferation (black bars) and from 14 uninfected controls (white bars).

Support for this study was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

sponded to fewer recall antigens than uninfected controls: while 83% of uninfected controls had specific PBMC proliferative responses to three or more different antigens, PBMC from HTLV-1-infected SP+ individuals were unable to recognize more than one antigen ($P < 0.0001$). Moreover, only 33% of HTLV-1-infected individuals without spontaneous PBMC proliferation responded to three or more antigens ($P = 0.038$).

TCR-V β analysis disclosed polyclonal expansion only in HTLV-1-infected individuals with spontaneous proliferation of PBMC. As shown in Fig. 2A, polyclonal expansion of CD4 $^+$ cells (TCR-V β families 2, 3.1, 6.1, 8, 11, 12, 16, 17, 21.3, and 22) was observed in patients with spontaneous PBMC proliferation. In contrast, HTLV-1-infected individuals without spontaneous PBMC proliferation had CD4 TCR-V β repertoires similar to those of uninfected individuals (Fig. 2B).

HTLV-1, K. Nagata, M. Hatanaka, W. Sakai, T. Natsugawa, K. I. Kinoshita, Y. Saitoh, and M. Yoshida. 1981. Adult T-cell leukemia: antigen and CD4 expression on the surface of neoplastic T-lymphocytes. *Leukemia* 4:101-107.

10. Saitoh, Y., and D. A. Hafler. 1993. Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic viruses. *Immunol. Rev.* 134:117-132.

11. Uchi, M., T. Matsuda, T. Mizuno, M. Yoshida, T. Itohara, K. Kodama, T. Mizuno, Y. Maruyama, S. Saitoh, M. Yoshida, and M. Otsuka. 1991. Antigen in a T-cell lymphoma: HTLV-1-associated antigen. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 626:1-10.

12. Uchi, M., J. Matsuoka, T. Mizuno, T. Saitoh, I. M. Strosser, T. Saitoh, and M. Otsuka. 1993. In vivo generation of CD4 $^+$ regulatory T cells by HTLV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:126-130.

13. Uchi, M., M. Otsuka, T. Saitoh, I. M. Strosser, T. Saitoh, and M. Otsuka. 1993. Polyclonal expansion of CD4 $^+$ T lymphocytes with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Immunol. Rev.* 139:250-264.

14. Uchi, M., T. Saitoh, Y. Maruyama, S. Uchi, M. Otsuka, Y. Maruyama, and M. Otsuka. 1999. Polyclonal expansion of CD4 $^+$ T lymphocytes with HTLV-1 infection. *Immunol. Rev.* 171:120-134.

15. Krutcher, A., S. Jacobsen, J. P. Roeder, E. L. Murphy, S. Z. Wiktor, R. Crandall, J. P. Figueroa, D. B. Clark, D. McFarlane, and W. A. Sattler. 1999. Spontaneous lymphocyte proliferation in synovial fluid HTLV-1-positive individuals. *Lancet* 353:1021-1022.

16. Saitoh, Y., and S. Takahashi. 1984. Impairment of cell-mediated immune response in HTLV-1-associated lymphopathy. *J. Neurol. Sci.* 109:111-119.

17. Laitinen, L., J. Mäkeläinen, V. Pöyry, P. Crandall, and W. Metzger. 1995. Infectious aetiology of human cataracts: a marker for HTLV-1 infection. *Lancet* 346:1399-1401.

18. Matsuoka, N. E., J. L. Lindhacker, P. Sledge, and S. C. Knight. 1992. Immature cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate atypical lymphocytic proliferation. *AIDS Res. Rep.* 5:109-109.

19. Matsuoka, N. E., J. L. Lindhacker, A. Manna, P. D. Levin, R. J. Gendler, and M. Otsuka. 1993. HTLV-1 and HTLV-1 world-wide distribution. *Immunol. Rev.* 134:255-269.

20. Matsuoka, N. E., S. Iizuma, and M. Otsuka. 1999. HTLV-1-associated lymphopathy: a type I (HTLV-1)-induced idiopathic mononucleosidotropic spastic paraparesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 883:138-145.

21. Matsuoka, N. E., K. Yamashita, K. Takatori, T. Watanabe, S. Mori, and K. Otsuka. 1992. HTLV-1 and optic atrophy. *Lancet* 339:1110.

DISCUSSION

Spontaneous proliferation is an immunological hallmark of PBMC from HTLV-1-infected individuals. This phenomenon is observed in up to 50% of cultures from PBMC from HTLV-1 carriers (28). In this study, we evaluated the cellular immune responses from HTLV-1-infected individuals with PBMC showing and not showing spontaneous proliferation. Compared to uninfected controls, HTLV-1-infected individuals with PBMC presenting spontaneous proliferation had an increased proportion of CD4 T cells expressing CD45RO. Moreover, TCR-V β analysis showed a polyclonal expansion of almost all V β families studied concerning CD4 T-cell subsets. In addition, HTLV-1-infected individuals with spontaneous PBMC proliferation had markedly reduced stimulation indexes for candidin, PPD, tetanus toxoid, and cytomegalovirus.

Therefore, responses to these recall antigens could not be detected by cell proliferation.

The absence of detectable cellular immune responses to recall antigens in individuals with spontaneous PBMC proliferation was expected, since high levels of spontaneous proliferation would mask a specific response to the recall antigens evaluated by the stimulation index. However, previous findings support the idea that there could be different levels of T-cell anergy among HTLV-1-infected individuals.

One of the most important observations of this study was that cells from HTLV-1-infected individuals with PBMC without spontaneous proliferation showed significant decreases in the stimulation indexes to candidin, PPD, and tetanus toxoid. In addition, only 33% were able to recognize more than two antigens; in contrast, 83% of uninfected controls were able to recognize three or more antigens. In those individuals, detectable expansion of CD4⁺ T lymphocytes was not identified by quantification of memory or naïve CD4⁺ T-cell subsets, and analysis of TCR-V β by flow cytometry showed that their cells did not have polyclonal activation. Therefore, the mechanisms involved in the impairment of T lymphocytes from HTLV-1-infected individuals without spontaneous proliferation are unclear. These mechanisms could differ from those in HTLV-1-infected individuals with spontaneous PBMC proliferation. In addition, several other hypotheses are possible, such as the presence of regulatory T cells (9), impairment of antigen-presenting cells or inability of PBMC from HTLV-1-infected individuals to respond to interleukin-12 (32). Dendritic cells are the most potent antigen-presenting cells and produce interleukin-12, are targeted by HTLV-1, and stimulate the autologous proliferation of T lymphocytes *in vitro* (16, 18).

In conclusion, our results strongly suggest that HTLV-1-infected individuals show immunosuppression, as reflected by decreases in the stimulation indexes to recall antigens, even in individuals without spontaneous PBMC proliferation. The implication of these findings on the risk of HTLV-1-infected individuals developing other infectious diseases remains unknown. Further studies should be conducted in an attempt to clarify these questions.

ACKNOWLEDGMENTS

Support for this study was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo a Pesquisa da Bahia (FAPESB).

We thank Lain Pontes de Carvalho for critical review of the manuscript. We also thank José Fernando O. Costa for technical assistance.

REFERENCES

- Chieffi, P. P., C. S. Chiattonne, E. N. Feltrim, R. C. Alves, and M. A. Paschoalotti. 2000. Coinfection by *Strongyloides stercoralis* in blood donors infected with human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 in Sao Paulo City, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95:711-712.
- Dourado, I., L. C. Alcantara, M. L. Barreto, M. da Gloria Teixeira, and B. Galvao-Castro. 2003. HTLV-1 in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 34:527-531.
- Edlich, R. F., J. A. Arnette, and F. M. Williams. 2000. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1). *J. Emerg. Med.* 18:109-119.
- Galvao-Castro, B., L. Loures, L. G. Rodrigues, A. Sereno, O. C. Ferreira, Jr., L. G. Franco, M. Muller, D. A. Sampaio, A. Santana, L. M. Passos, and F. Proietti. 1997. Distribution of human T-lymphotropic virus type 1 among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion* 37:242-243.
- Gessain, A., F. Barin, J. C. Vernant, O. Gout, L. Maurs, A. Calender, and G. de The. 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-1 in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* ii:407-410.
- Hinuma, Y., K. Nagata, M. Hanaoka, M. Nakai, T. Matsumoto, K. I. Kinoshita, S. Shirakawa, and J. Miyoshi. 1981. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6476-6480.
- Hollberg, P., and D. A. Hafler. 1993. Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 328:1173-1182.
- Ijichi, S., T. Matsuda, I. Maruyama, T. Izumihara, K. Kojima, T. Niimura, Y. Maruyama, S. Sonoda, A. Yoshida, and M. Osame. 1990. Arthritis in a human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) carrier. *Ann. Rheum. Dis.* 49:718-721.
- Iwashiro, M., R. J. Messer, K. E. Peterson, J. M. Stromnes, T. Sugle, and K. J. Hasenkrug. 2001. Immunosuppression by CD4⁺ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:9226-9230.
- Kaplan, M. H. 1993. Human retroviruses and neoplastic disease. *Clin. Infect. Dis.* 17(Suppl. 2):S400-S406.
- Kashala, O., R. Marlink, M. Ilunga, M. Diese, B. Gormus, K. Xu, P. Mukeba, K. Kasongo, and M. Essex. 1994. 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.* 169:296-304.
- Kitajima, I., I. Maruyama, Y. Maruyama, S. Ijichi, N. Eiraku, Y. Mimura, and M. Osame. 1989. Polyarthritides in human T lymphotropic virus type 1-associated myelopathy. *Arthritis Rheum.* 32:1342-1344.
- Kramer, A., S. Jacobson, J. F. Reuben, E. L. Murphy, S. Z. Wiktor, B. Cranston, J. P. Figueroa, B. Hanchard, D. McFarlin, and W. A. Blattner. 1989. Spontaneous lymphocyte proliferation in symptom-free HTLV-1 positive Jamaicans. *Lancet* ii:923-924.
- Kuroda, Y., and H. Takashima. 1990. Impairment of cell-mediated immune responses in HTLV-1-associated myelopathy. *J. Neurol. Sci.* 100:211-216.
- LaGrenade, L., B. Hanchard, V. Fletcher, B. Cranston, and W. Blattner. 1990. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-1 infection. *Lancet* 336:1345-1347.
- Macatonia, S. E., J. K. Cruickshank, P. Rudge, and S. C. Knight. 1992. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 8:1699-1706.
- Madeleine, M. M., S. Z. Wiktor, J. J. Goedert, A. Manns, P. H. Levine, R. J. Biggar, and W. A. Blattner. 1993. HTLV-1 and HTLV-II world-wide distribution: reanalysis of 4,832 immunoblot results. *Int. J. Cancer* 54:255-260.
- Makino, M., S. Shimokubo, S. I. Wakamatsu, S. Izumo, and M. Baba. 1999. The role of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-infected dendritic cells in the development of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Virol.* 73:4575-4581.
- Marsh, B. J. 1996. Infectious complications of human T cell leukemia/lymphoma virus type 1 infection. *Clin. Infect. Dis.* 23:138-145.
- Mochizuki, M., K. Yamaguchi, K. Takatsuki, T. Watanabe, S. Mori, and K. Tajima. 1992. HTLV-1 and uveitis. *Lancet* 339:1110.
- Moreira, E. D., Jr., T. T. Ribeiro, P. Swanson, C. Sampaio Filho, A. Melo, C. Brites, R. Badaro, G. Toedter, H. Lee, and W. Harrington, Jr. 1993. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in northeastern Brazil. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 6:959-963.
- Morgan, O. S., P. Rodgers-Johnson, C. Mora, and G. Char. 1989. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet* ii:1184-1187.
- Murai, K., N. Tachibana, S. Shioiri, E. Shishime, A. Okayama, J. Ishizaki, K. Tsuda, and N. Mueller. 1990. Suppression of delayed-type hypersensitivity to PPD and PHA in elderly HTLV-I carriers. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 3:1006-1009.
- Osame, M., K. Usuku, S. Izumo, N. Ijichi, H. Amitani, A. Igata, M. Matsumoto, and M. Tara. 1986. HTLV-1 associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* i:1031-1032.
- Pedral-Sampaio, D. B., E. Martins Neto, C. Pedrosa, C. Brites, M. Duarte, and W. Harrington, Jr. 1997. Co-infection of tuberculosis and HIV/HTLV retroviruses: frequency and prognosis among patients admitted in a Brazilian hospital. *Braz. J. Infect. Dis.* 1:31-35.
- Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7415-7419.
- Popovic, M., N. Flomenberg, D. J. Volkman, D. Mann, A. S. Fauci, B. Dupont, and R. C. Gallo. 1984. Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-1 or HTLV-II. *Science* 226:459-462.
- Prince, H. E., H. Lee, E. R. Jensen, P. Swanson, D. Weber, L. Fitzpatrick, M. Doyle, and S. Kleinman. 1991. Immunologic correlates of spontaneous lymphocyte proliferation in human T-lymphotropic virus infection. *Blood* 78:169-174.
- Prince, H. E., J. York, S. M. Owen, and R. B. Lal. 1995. Spontaneous proliferation of memory (CD45RO⁺) and naïve (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.* 102:256-261.
- Robinson, R. D., J. F. Lindo, F. A. Neva, A. A. Gam, P. Vogel, S. I. Terry, and

- E. S. Cooper. 1994. Immunoepidemiologic studies of *Strongyloides stercoralis* and human T lymphotropic virus type I infections in Jamaica. *J. Infect. Dis.* **169**:692-696.
31. Setoguchi, Y., S. Takahashi, T. Nukiwa, and S. Kira. 1991. Detection of human T-cell lymphotropic virus type I-related antibodies in patients with lymphocytic interstitial pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**:1361-1365.
32. Suzuki, M., C. S. Dezzutti, A. Okayama, N. Tachibana, H. Tsubouchi, N. Mueller, and R. B. Lal. 1999. Modulation of T-cell responses to a recall antigen in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**:713-717.
33. Tachibana, N., A. Okayama, J. Ishizaki, T. Yokota, E. Shishime, K. Murai, S. Shioiri, K. Tsuda, M. Essex, and N. Mueller. 1988. Suppression of tuberculin skin reaction in healthy HTLV-I carriers from Japan. *Int. J. Cancer* **42**:829-831.
34. Uchiyama, T., J. Yodoi, K. Sagawa, K. Takatsuki, and H. Uchino. 1977. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **50**:481-492.
35. Vrielink, H., and H. W. Reesink. 2004. HTLV-I/II prevalence in different geographic locations. *Transfus. Med. Rev.* **18**:46-57.
36. Welles, S. L., N. Tachibana, A. Okayama, S. Shioiri, S. Ishihara, K. Murai, and N. E. Mueller. 1994. Decreased reactivity to PPD among HTLV-I carriers in relation to virus and hematologic status. *Int. J. Cancer* **56**:337-340.

4. Capítulo III

Avaliação do perfil de ativação e produção de IFN- γ dos linfócitos T de indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de ativação dos linfócitos T de indivíduos infectados pelo HTLV-1, apresentando ou não proliferação espontânea.

Para realizar este estudo nós verificamos a frequência de células produtoras de IFN- γ e expressando moléculas de ativação, em linfócitos T CD4+ e T CD8+ de indivíduos infectados e em controles não infectados, por citometria de fluxo.

Manuscrito em preparação

Capítulo III

Avaliação do perfil de ativação e produção de IFN- γ dos linfócitos T de indivíduos infectados pelo vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1)

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de ativação dos linfócitos T de indivíduos infectados pelo HTLV-1, apresentando ou não proliferação espontânea.

Para realizar este estudo nós verificamos a frequência de células produtoras de IFN- γ e expressando moléculas de ativação, em linfócitos T CD4+ e T CD8+ de indivíduos infectados e em controles não infectados, por citometria de fluxo.

Manuscrito em preparação

Resumo

Nós demonstramos recentemente que indivíduos infectados pelo HTLV apresentam uma imunossupressão, demonstrada pela redução no índice de estimulação aos antígenos de memória, inclusive em indivíduos sem proliferação espontânea (SP). Em nosso estudo, avaliamos, por citometria de fluxo, a expressão das moléculas CD25, CD28, CD69, CD62L, HLA-DR e detecção intracelular de IFN- γ em subpopulações de linfócitos T de indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentando ou não proliferação espontânea. As freqüências de linfócitos T CD4+CD45RO+CD25+ e CD4+HLA-DR+ nos indivíduos infectados SP+ (7%, 18%) e SP- (14%, 17%) foram superiores aos controles não infectados (4%, 8%,) ($p < 0.04$; $p < 0.006$, respectivamente). Em contraste, a freqüência de linfócitos T CD4+CD62L+ foi menor em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com proliferação espontânea (65%) comparado aos não infectados (80%) ($p = 0.02$). A proporção de linfócitos CD4+ IFN- γ + foi maior apenas nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 com SP+ (6%) comparado aos não infectados (1%) ($p = 0.003$). Nas subpopulações de linfócitos T CD8+, a expressão das moléculas CD62L e CD28 foi menor em indivíduos infectados pelo HTLV-1 SP+ (43%, 60%, respectivamente), comparado aos controles não infectados (43%, 63%, $p = 0.02$; e 60%, 92%, $p = 0.0008$, respectivamente). A expressão da molécula CD28 em subpopulações de linfócitos T CD8+ foi também menor nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem proliferação (SP-) comparado aos não infectados (74%, 92%; $p = 0.03$). A proporção de linfócitos T CD8+ IFN- γ + foi ligeiramente maior em indivíduos infectados pelo HTLV-1 ($p > 0.05$). Nós observamos uma correlação positiva entre a carga proviral do HTLV e SP ($R = 0.3$, $p = 0.02$), proporção de linfócitos T CD4+CD25+ ($R = 0.4$, $p = 0.02$) e CD4+CD45RO+ ($R = 0.4$, $p = 0.03$). Nossos resultados sugerem que a ativação celular e produção de IFN- γ estão presentes em indivíduos infectados, mesmo naqueles sem SP. Este fenômeno pode estar implicado no desenvolvimento de imunossupressão nestes indivíduos.

Palavras-chave: HTLV-1, ativação, imunossupressão

Abstract

We have recently demonstrated that HTLV-I infected individuals show immunosuppression, as reflected by a decrease in stimulation index to recall antigens, even in individuals without spontaneous PBMC proliferation (SP). In this study, we evaluated by flow cytometry the expression of CD25, CD28, CD69, CD62L, HLA-DR molecules and intracellular IFN- γ on T cell subsets from HTLV-1 infected individuals presenting or not SP. Frequencies of CD4+CD45RO+CD25+ and CD4+HLA-DR+ T lymphocytes in both HTLV infected individuals SP+ (7%, 18%) and SP- (14%, 17%) were higher than uninfected controls (4%, 8%,) ($p < 0.04$; $p < 0.006$, respectively). In contrast, CD4+CD62L+ T lymphocytes was decreased in HTLV-1-infected individuals with SP+ (65%) compared to uninfected controls (80%) ($p = 0.02$). The proportion of CD4+ IFN- γ + T cells was higher only in HTLV-1-infected individuals SP+ (6%) compared to uninfected controls (1%) ($p = 0.003$). In the CD8+ T-subset, the expression of CD62L and CD28 molecules was decreased in HTLV-infected individuals SP+ (43%, 60%, respectively), compared to uninfected controls (43%, 63%, $p = 0.02$; and 60%, 92%, $p = 0.0008$, respectively). The expression of CD28 molecules in CD8+ T-subset was also decreased in HTLV infected individuals without SP compared to uninfected controls (74%, 92%; $p = 0.03$). The proportion of CD8+ IFN- γ + T-cells was slightly increased in HTLV-1-infected individuals ($p > 0.05$). We observed a positive correlation between HTLV proviral load and SP ($R = 0.3$, $p = 0.02$), proportion of CD4+CD25+ ($R = 0.4$, $p = 0.02$) and CD4+CD45RO+ ($R = 0.4$, $p = 0.03$) T-lymphocytes. Our results suggest that cellular activation and IFN- γ production are present in HTLV-1-infected individuals, even without SP. This phenomenon can play a role in the immunosuppression.

Keywords: HTLV-1, activation, immunosuppression

Material e Métodos

Pacientes. Foram avaliados neste estudo setenta e dois indivíduos infectados pelo HTLV-1 (dezenove com HAM/TSP e cinquenta e três assintomáticos) provenientes do Centro de Referência de Portadores do HTLV-1 da Fundação para o Desenvolvimento das Ciências/FIOCRUZ. Oito controles não infectados e voluntários, constituídos por estudantes do Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP/CPqGM/FIOCRUZ). Todas as amostras foram testadas para presença de anticorpos anti-HTLV-1/2 por ensaio imunoenzimático, ELISA (Ab-Capture ELISA Test System – Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, New Jersey). As amostras reagentes foram confirmadas por Western Blot (HTLV Blot 2.4, Geneslabs Technologies, Singapore). O diagnóstico de HAM/TSP seguiu os critérios da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1990). Todos os pacientes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ.

Ensaio de Linfoproliferação. Os ensaios de linfoproliferação foram realizados com PBMC total de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles não infectados, obtidos por gradiente de Ficoll-Hypaque, a partir de amostras de sangue heparinizado. As células (1×10^5 /poço), em triplicata, foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado com 2mM L-glutamina, 1% de aminoácidos não-essenciais, 1mM de piruvato de sódio, 100 U/ml de penicillina, 100 µg/ml de streptomina. Após 5 dias de cultura, as células foram pulsadas por 16h com $1 \mu\text{Ci}$ 3H-timidina (ICN, Costa Mesa, CA). A 3H-timidina incorporada foi mensurada com líquido de cintilação em beta-counter (Direct Beta Counter, Matrix 9600 - Packard). Os resultados foram apresentados em contagens por minuto (cpm). Uma média de cpm ≥ 500 , em

células não estimuladas foi considerada com proliferação espontânea. Este valor é três vezes maior que a média em cpm de PBMC não estimulados dos indivíduos controles (159 ± 138 cpm; de 6 a 462).

Citometria de fluxo

Marcação membranar. Para estas análises, 50 μ l de sangue total colhido em tubo contendo EDTA, de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles não infectados foram incubados com anticorpos monoclonais por 30 min à temperatura ambiente. As hemácias foram lisadas com solução de lise (FACS lysing solution Becton-Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA). As células foram então lavadas três vezes em 2,0 ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 1% de soro albumina bovina (BSA), 0,4% de paraformaldeído (PFA), e 0,01% de azida sódica (PBS-BSA-PFA-azida). Após as lavagens, as células foram mantidas em PBS contendo PFA a 4%. Para quantificar a expressão de marcadores de ativação nas populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, as amostras foram incubadas em presença de anticorpos monoclonais anti-CD4 marcado com phycoerythrin (PE) (BD Pharmingen Technical) ou phycoerythrin cyanin (PC5) (Immunothec, a Beckman Coulter Company); e anti-CD8-PC5 ou isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Immunothec) e os seguintes anticorpos monoclonais: CD25-FITC; CD69-PE; CD62L-FITC; CD28-FITC; HLA-DR-PE. As amostras foram adquiridas utilizando Facscan e as análises utilizando Cellquest software (Becton Dickinson, Mountsin View, Calif).

Detecção intracelular de IFN- γ . PBMCs de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles não infectados foram isolados por gradiente de Ficoll-Hypaque, a partir de amostras de sangue heparinizado. As células (2×10^5 PBMCs/poço) foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM L-glutamina, 1% de aminoácidos não-essenciais, 1 mM de piruvato de sódio, 100 U/ml penicilina,

100 µg/ml streptomicina, por 4 horas, na presença ou ausência de 2µg/ml de fitohemaglutinina (PHA) (Sigma). Em seguida, 3µg de monensina e 3µg brefaldina foram acrescentadas à cultura, diluídas em soro AB humano, a uma concentração final de 10% (Sigma). Após 16 horas de incubação, as células foram lavadas duas vezes em 2,0 ml de PBS-BSA-PFA-azida. Para a marcação membranar, as células foram incubadas com os anticorpos anti-CD4-PC5 e anti-CD8-FITC, como descrita anteriormente. Para a marcação intracelular, as células foram inicialmente fixadas com 200µl de PBS-BSA-PFA 4%, por 20 min, à temperatura ambiente, e lavadas duas vezes com PBS-BSA-Saponina 0,1% para promover a permeabilização da membrana. Os anticorpos anti-IFN- γ -PE ou controle isotípicos foram adicionados e as amostras incubadas por 30 min. As células foram lavadas com PBS-BSA-Saponina 0,1% e, em seguida, com PBS-BSA-PFA-azida. A aquisição e análise das marcações foram realizadas como descrito anteriormente.

Análises estatísticas. Os dados foram expressos em medianas e valores mínimo e máximo. A comparação entre as frequências da expressão das moléculas de ativação e da produção de IFN- γ dos grupos: indivíduos infectados pelo HTLV-1, indivíduos infectados com proliferação espontânea, indivíduos infectados sem proliferação espontânea, indivíduos infectados com HAM/TSP, indivíduos infectados assintomáticos, e controles não infectados foram realizados pelo teste não paramétrico, Mann-Whitney U test. A correlação entre as subpopulações linfocitárias e a expressão de moléculas de ativação ou produção de IFN- γ foram realizadas pela correlação de Spearman. Um valor de p menor do que 0,05 foi considerado como estatisticamente significativo. As análises foram realizadas utilizando o software BioEstat 3.0 (Sociedade Civil Mimirua/MCT-CNPq)

Resultados

Proliferação espontânea de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1

A proliferação espontânea foi observada em 50 de 72 (69%) dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 [13 com HAM/TSP (26%) e 37 assintomáticos (74%)]. Valores similares de cpm entre os pacientes com HAM (2667 ± 1932 cpm, de 728 a 5415 cpm) e os assintomáticos (1908 ± 1615 cpm, de 603 a 9436 cpm) foram observados ($p=0.3$).

A proliferação espontânea não foi observada em 22 de 72 (31%) dos indivíduos infectados [6 com HAM/TSP (27%) e 16 assintomáticos (73%)]. As médias de proliferação dos pacientes com HAM (273 ± 123 cpm, de 166 a 476 cpm) e assintomáticos (155 ± 145 cpm, de 7 a 415 cpm) foram semelhantes a da proliferação dos controles não infectados (159 ± 138 cpm, de 6 a 462 cpm) ($p=0.11$, $p=0.8$, respectivamente).

Avaliação da frequência de células produtoras de IFN- γ nas subpopulações de linfócitos T

Como observado na **Tabela 1**, a frequência de linfócitos T CD4+ produtores de IFN- γ nos indivíduos infectados é cerca de cinco vezes maior que a frequência dos controles não infectados ($p=0.003$). Quando analisamos esta proporção, em relação a presença ou não de proliferação espontânea, observamos a mesma tendência. Indivíduos infectados com proliferação espontânea apresentam uma frequência de células T CD4+ produtoras de IFN- γ de 6%, enquanto 1% dos linfócitos T CD4+ dos controles não infectados produzem IFN- γ ($p=0.002$). Observamos um aumento na frequência de linfócitos T CD4+ produtores de IFN- γ em indivíduos sem proliferação espontânea, embora sem significância estatística ($p=0.08$).

Não houve diferença na proporção de linfócitos T CD4+ produtoras de IFN- γ em relação a manifestação clínica. Em indivíduos com HAM/TSP a frequência de linfócitos T CD4+ produtores de IFN- γ foi 4% e em assintomáticos 7%, enquanto nos normais esta proporção foi de 1% ($p=0.007$, $p=0.003$, respectivamente) (dados não mostrados).

Em relação a subpopulação de linfócitos T CD8+ encontramos um aumento na proporção de células produtoras de IFN- γ nos indivíduos infectados (2%), especialmente aqueles com proliferação espontânea (2.3%), comparado aos controles não infectados (1%), embora estas diferenças não sejam estatisticamente significativas ($p=0.05$, $p=0.09$, respectivamente).

Além disso, observamos uma correlação positiva entre a intensidade de proliferação e a proporção de linfócitos T CD8+ produtoras de IFN- γ , nos indivíduos infectados ($r= 0.5$, $p=0.03$).

Tabela 1. Detecção intracelular de IFN- γ em linfócitos T, por citometria de fluxo, em indivíduos infectados pelo HTLV-1

Identificação	CD4+ (%)		CD8+ (%)	
	Espontânea	PHA	Espontânea	PHA
[A] HTLV – todos				
Mediana	5	11	2	4
Varição	0.2-36	0.8-31	0.2-48	0.1-45
n	21	20	19	21
[B] Proliferação +				
Mediana	6	10	2.3	3
Varição	0.6-11	0.8-31	0.3-48	0.1-45
n	16	15	14	16
[C] Proliferação -				
Mediana	5	14	1.4	6.6
Varição	0.2-36	2-85	0.2-7	4.1-8.4
n	5	5	5	5
[D] CN				
Mediana	1	3	1	3
Varição	0.4-1.5	0.8-4.3	0.4-1.4	1.7-10
n	8	8	8	8
Valores de p				
A vs. D	0.003	0.001	0.05	0.35
B vs. D	0.002	0.001	0.09	0.75
C vs. D	0.08	0.06	0.6	0.04
B vs. C	0.62	0.8	0.5	0.16

[A]- indivíduos infectados pelo HTLV-1 com proliferação espontânea CN- controle não-infectado

[B]- indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem proliferação espontânea

Diferenças entre os grupos foram analisadas por Mann-Whitney U test.

PBMCs de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles foram cultivados por 20 horas, na ausência e presença de 5 μ g/ml de PHA. Monensina e brefaldina (3 μ g/ml) foram adicionadas após as 4 h iniciais de incubação, para bloquear a excreção do IFN- γ .

Avaliação do perfil de ativação em linfócitos T CD4+ de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles não infectados.

Como observado na **Tabela 2**, a frequência de linfócitos T CD4+ expressando a molécula CD25 foi discretamente superior nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 (11.5%) em relação aos controles não-infectados (7%), embora esta diferença não tenha apresentado significância estatística ($p=0.22$). Entretanto, quando a expressão desta molécula foi analisada na subpopulação de linfócitos T de memória, T CD4+CD45RO+, observamos uma diferença significativa entre indivíduos infectados (7.5%), e controles não infectados (3%) ($p=0.03$). Além disso, a frequência de linfócitos T CD4+ expressando as moléculas CD69 e HLA-DR nos indivíduos infectados foi igualmente superior a dos controles não infectados.

A proporção de linfócitos T CD4+ expressando CD62L foi discretamente inferior nos indivíduos infectados pelo HTLV-1, comparado aos controles ($p=0.057$). A expressão de CD28 foi semelhante em ambos os grupos.

Quando analisamos a frequência de expressão destas moléculas nos indivíduos apresentando ou não proliferação espontânea, observamos um perfil semelhante em ambos os grupos. Um aumento da expressão de CD25, sobretudo na subpopulação de linfócitos T de memória (CD45RO+), e de CD69 foram observados nos linfócitos T CD4+ de indivíduos infectados sem proliferação espontânea ($p=0.034$) e ($p=0.01$), respectivamente.

Em relação à sintomatologia, os indivíduos com HAM/TSP apresentaram uma frequência aumentada de linfócitos T CD4+ expressando CD25+ (16%), comparada aos controles ($p=0.005$). Entretanto, na subpopulação de linfócitos T de memória (CD45RO+), a frequência de CD25+ foi maior tanto em pacientes com HAM/TSP, 8% ($p=0.01$), quanto assintomáticos 8% ($p=0.06$). Em pacientes com HAM/TSP um aumento na expressão de HLA-DR ($p=0.02$) e uma diminuição de CD62L ($p=0.01$) foram observados. A expressão de CD69 foi

igualmente elevada em pacientes com HAM/TSP e assintomáticos ($p=0.03$, $p=0.02$, respectivamente) (dados não mostrados).

Tabela 2. Frequências de marcadores de ativação celular em linfócitos em linfócitos T CD4+ de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles não-infectados

Identificação	CD25 (%)	CD25+ CD45RO+ (%)	CD69 (%)	CD62L (%)	CD28 (%)	DR (%)
[A] HTLV - todos						
Mediana	11.5	7.5	6	72	97	18
Varição	2-45	1-42	0.5-27	42-93	43-100	3.3-54
n	38	34	27	35	34	29
[B] Proliferação +						
Mediana	11	7	5	65	97	18
Varição	2-45	2-32	1-23	42-93	43-100	8-54
n	24	21	15	21	14	15
[C] Proliferação -						
Mediana	14	14	8	77	98	17
Varição	2-36	1-42	0.5-27	43-85	71-100	3.3-36
n	14	13	12	14	20	14
[D] CN						
Mediana	7	3	1.3	85	98	8
Varição	3-13	2.4-9	0.3- 1.9	72-90	93-99	5-23
n	5	5	5	5	5	5
Valores de p						
A vs. D	0.22	0.03	0.02	0.057	0.4	0.048
B vs. D	0.2	0.055	0.049	0.055	0.24	0.054
C vs. D	0.3	0.034	0.01	0.11	0.9	0.09
B vs. C	0.9	0.25	0.4	0.09	0.12	0.7

[A]- Grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentando proliferação espontânea de PBMC.

[B]- Grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem proliferação espontânea de PBMC.

CN- controles não-infectados

Diferenças entre os grupos foram analisadas por Mann-Whitney U test.

Avaliação do perfil de ativação em linfócitos T CD8+ de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles não infectados.

Como demonstrado Tabela 3, a frequência de linfócitos T CD8+ expressando CD25 nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 foi similar aos controles não-infectados ($p=0.35$). Um aumento na frequência de linfócitos expressando CD69 (8%), e uma diminuição na frequência da expressão de CD62L (48%) foram observadas nestes indivíduos, comparados aos controles não infectados (1%, $p=0.003$, e 69%, $p=0.016$, respectivamente). A expressão de HLA-DR foi discretamente aumentada, embora esta diferença não apresente diferença significativas.

Quando analisamos a frequência de expressão destas moléculas nos indivíduos apresentando ou não proliferação espontânea, observamos um perfil semelhante em ambos os grupos. A expressão de CD69 foi aumentada tanto no grupo com proliferação (9%, $p=0.007$), como sem proliferação espontânea (6%, $p=0.007$), comparada aos controles não infectados. Os pacientes apresentando proliferação espontânea apresentaram uma diminuição na expressão de CD62L (43%), e de CD28 (60%), comparado aos controles (69%, $p=0.015$, e 72%, $p=0.04$, respectivamente). Além disso, a redução na frequência de linfócitos T CD8+ expressando CD28 nos indivíduos infectados com proliferação espontânea mostrou uma correlação inversa com a proliferação ($r=-0.4$, $p=0.02$).

Em relação à sintomatologia, observamos um aumento de CD69 e uma diminuição de CD62L tanto em indivíduos com HAM/TSP (5%, $p=0.022$, 39%, $p=0.007$, respectivamente), quanto em assintomáticos (11% $p=0.001$, 52%, $p=0.03$, respectivamente). Os indivíduos com HAM/TSP também apresentaram uma diminuição na expressão de CD28 (50%, $p=0.03$) (dados não mostrados).

Tabela 3. Frequências de marcadores de ativação celular em linfócitos em linfócitos T CD8+ de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e controles não-infectados

Identificação	CD25 (%)	CD69 (%)	CD62L (%)	CD28 (%)	DR (%)
[A] HTLV - todos					
Mediana	5	8	48	63	23
Varição	0.5-16	0.5-34	8-84	41-98	6-78
n	23	24	32	31	26
[B] Proliferação +					
Mediana	5	9	43	60	29
Varição	0.5-15	1-34	8-84	41-98	6-78
n	14	14	22	21	16
[C] Proliferação -					
Mediana	8	6	54	74	18
Varição	2-16	0.5-20	31-70	51-92	8-63
n	9	10	10	10	10
[D] CN					
Mediana	3	1	69	72	11
Varição	2-5.6	0.1-2	52-77	69-91	6-33
n	5	5	5	5	5
Valores de p					
A vs. D	0.35	0.003	0.016	0.1	0.26
B vs. D	0.6	0.007	0.015	0.04	0.24
C vs. D	0.16	0.007	0.07	0.6	0.4
B vs. C	0.3	0.6	0.2	0.06	0.3

[A]- Grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentando proliferação espontânea de PBMC.

[B]- Grupo de indivíduos infectados pelo HTLV-1 sem proliferação espontânea de PBMC.

CN- controles não-infectados

Diferenças entre os grupos foram analisadas por Mann-Whitney U test.

5. Capítulo IV

Quinoline compounds decrease *in vitro* spontaneous proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from Human T-cell Lymphotropic Virus type-I (HTLV-I)-infected individuals

O objetivo deste trabalho foi avaliar a inibição da proliferação celular em indivíduos infectados pelo HTLV por compostos quinolínicos.

Para realizar este estudo, inicialmente avaliamos a toxicidade dos compostos quinolínicos em PBMC de indivíduos não infectados pelo HTLV-1. Vinte e dois compostos foram testados pelos métodos XTT e azul de tripam nas concentrações de 10, 50 e 100 μ M. Os compostos foram considerados não tóxicos quando as células testadas apresentaram viabilidade maior ou igual a 85%. Em seguida identificamos entre os não-tóxicos, os compostos quinolínicos capazes de inibir a proliferação espontânea *in vitro* de células de indivíduos infectados. Finalmente, avaliamos a toxicidade dos compostos quinolínicos em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV.

Manuscrito finalizado para submissão

Quinoline compounds decrease *in vitro* spontaneous proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from Human T-cell Lymphotropic Virus type-I (HTLV-1)-infected patients

Running Title: Effect of quinolines on HTLV-1-induced spontaneous PBMC proliferation

Fernanda Grassi^{1,2}, Rita Elizabeth Mascarenhas^{1,2}, Ana Beatriz Guimarães¹, Bernardo Galvão^{1,2}, Blandine Séon-Méniel,³ Fanny Schmidt,³ Xavier Franck,³ Bruno Figadère,³ Reynald Hocquemiller,³ Alain Fournet^{3,4*}

- 1- Advanced Laboratory of Public Health/ CPQGM – Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador – Bahia – Brazil
- 2- Bahiana School of medicine and Public Health, Salvador – Bahia – Brazil
- 3- Laboratoire de Pharmacognosie-associé au CNRS (UMR 8076-BioCIS), Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France
- 4- IRD US 084, Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

* Corresponding author. Mailing address: IRD US 084, Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, rue J. B. Clément, 92296, Châtenay-Malabry cedex, France. Phone : 33 (0)1 46 83 55 94, Fax : 33 (0)1 46 83 53 99. Email : Alain.Fournet@ird.fr

RESUMO

A proliferação espontânea *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) é um achado imunológico importante em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Este achado pode ter um papel importante na patogênese das doenças associadas ao HTLV-1. Compostos quinolínicos inibem, *in vitro*, a proliferação de células de linhagem transformadas pelo HTLV-1. No presente estudo, nós testamos a capacidade de compostos quinolínicos em inibir a proliferação celular espontânea de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Vinte e duas quinolinas foram avaliadas. A toxicidade foi inicialmente testada em PBMC de doadores não infectados pelos métodos Azul de Tripán e do sal Tretazolium (XTT), e então a atividade antiproliferativa foi mensurada por um ensaio clássico de linfoproliferação em PBMC de três HTLV-1 indivíduos infectados pelo HTLV-1, na presença de concentrações decrescentes das quinolinas (de 100 μM a 0.8 μM), após cinco dias de cultura.

Treze dos vinte e dois compostos foram classificados como não-tóxicos para PBMC de indivíduos não infectados a 100, 50 e 10 μM . Existe uma estreita correlação entre a viabilidade testada pelos métodos Azul de Tripán e XTT para todas as drogas testadas nas diferentes concentrações. Seis compostos apresentaram capacidade inibitória superior a 70% da proliferação espontânea: **5-7**, **10**, **20** e **23**. Nossos resultados indicam que algumas quinolinas bloqueiam a proliferação espontânea em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Nós estamos conduzindo experimentos para investigar os mecanismos envolvidos neste fenômeno.

ABSTRACT

Spontaneous proliferation *in vitro* is the immunological hallmark of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HTLV-1-infected. This phenomenon may play a role in the pathogenesis of HTLV-1-associated diseases. Quinoline compounds down regulate *in vitro* cell proliferation of HTLV-1 transformed cell lines. In the present study we assessed the capacity of quinolines to inhibit spontaneous cell proliferation of PBMC from HTLV-1 infected individuals. Twenty-two quinolines were evaluated. Toxicity was first assessed on PBMC from healthy donors by both Trypan Blue and Tretazolium Salt (XTT) methods and then the antiproliferative effect was measured by a classic lymphoproliferative assay on PBMC from three HTLV-1-infected individuals, in the presence of decreasing concentrations of quinolines (from 100 μ M to 0.8 μ M), after 5 days of culture.

Thirteen out of twenty-two compounds were classified as non-toxic to PBMC from uninfected individuals at 100, 50 and 10 μ M. There was a straight correlation between viability assessed by the Trypan Blue and XTT methods for all drugs tested at different concentrations. Six compounds presented a capacity to inhibit more than 70% of the spontaneous proliferation: **5-7**, **10**, **20** and **23**. Our results indicate that some quinolines block spontaneous proliferation of PBMC from HTLV-1-infected individuals. We are now conducting experiments to investigate the mechanisms involved in this phenomenon.

INTRODUCTION

Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a human retrovirus that causes a wide spectrum of diseases affecting about 10-20 million people worldwide (4). There is a large endemic foci of HTLV-1 infection in Japan, Caribbean, Melanesia, Central and West Africa and South America (22, 37). In South America, Brazil has the higher absolute number of HTLV-1-infected individuals, particularly in Salvador, a city in the Northeast of Brazil, where 2% of inhabitants are infected (3).

HTLV-1 is the etiologic agent of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) (13, 30) and adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) (15, 31, 36). It is suspected that HTLV-1 is associated with many other diseases, but apparently 90% of those infected remain asymptomatic. Particularly, HTLV-1 has been associated with inflammatory disorders such as uveitis (27), child-infective dermatitis (21), arthritis(16, 19), polymyositis(28), and lymphocytic interstitial pneumonia(35). Moreover, there is an interaction between HTLV-1 infection and strongyloidiasis (33), tuberculosis (23) and Hansen's disease (17).

From the biological point of view, HTLV infection is responsible for T-cell spontaneous proliferation *in vitro* (20, 25, 32). The memory T CD45RO+ subset is the principal T-cell population involved in this phenomenon (34). The viral Tax protein is considered to have a central role in the process, modulating the expression of many cellular genes involved in activation of T-cells proliferation, such as interleukin-2 (IL-2) and α subunit of its receptor (IL-2R), granulocyte-macrophage colony stimulating factor, tumor necrosis factor- α (TNF- α), and others (1).

There are no effective drugs that treat the HTLV-1 infection. Vitamin C has demonstrated a partial effect on HAM/TSP symptoms (18). Antiretroviral drugs such as

zidovudin (AZT) and zalcitabin (ddC) have inhibited replication of HTLV-1 *in vitro* (2), but there are no clinical trials to corroborate this benefit. IFN- α has also demonstrated to inhibit viral replication and spontaneous proliferation *in vitro* (14). Nevertheless, the high cost of this treatment limits its application, particularly in developing countries. Conventional chemotherapy used in ATLL has demonstrated limited effects, with low rates of clinical therapeutic responses.

Recently, quinoline compounds have demonstrated an inhibitory effect on proliferation from HTLV-1 transformed line cells (10, 11). These quinolines are either alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian plant with medicinal properties (8), or were synthetically produced (5, 24). Several quinoline derivatives have shown very promising activity against several parasite infections such as cutaneous leishmaniasis (9), *Plasmodium vinckei petteri* (12) and experimental *Trypanosoma cruzi* infection in mice (29). In addition, these compounds are capable to inhibit the activity of the integrase enzyme of HIV-1 (26, 38).

In this study, we evaluate the inhibitory effect of twenty-two quinolines on spontaneous proliferation of PBMC from HTLV-1-infected individuals. In this way, we expect to contribute to identify new drugs for the treatment of HTLV-1- associated diseases.

MATERIALS AND METHODS

Patients. Samples were obtained from twenty-four asymptomatic HTLV-1-infected individuals from HTLV-1 Reference Development of Science Foundation and eleven healthy individuals from Bahia State Blood Bank (HEMOBA) both centers located at Salvador, Bahia – Brazil. All samples were screened for HTLV-1/2 antibodies by enzyme-immune assay (ELISA) (Ab-Capture ELISA Test System - Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, New Jersey) and confirmed by Western blot assay (HTLV Blot 2.4, Genelabs Technologies, Singapore). The Ethical Board of Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) approved this study, and informed consent was obtained from all enrolled patients.

Quinolines. Compounds **2-23** were prepared according to previously published methods (See Figure 1). 2-Propenyl-quinoline **2** was obtained from quinoline **1a** as already reported (6). Compounds **3-6** were obtained by treatment of 2-quinaldine **1c** with the appropriate aldehyde in acetic anhydride (7). Compound **7** was obtained by treatment of 8-hydroxy-2-methyl quinoline **1b** by butyllithium followed by addition of ethanal, as reported in (7). Compounds **17** and **18** were obtained as well, when 2-methyl quinoline (2-quinaldine) **1c** was treated by butyllithium followed by addition of ethanal, or benzaldehyde, respectively. Treatment of 2-quinaldine **1c** by butyllithium followed by addition of dimethoxyglyoxaldehyde, afforded compound **8**, which under oxidation conditions afforded compound **9**. Ethylmagnesium bromide addition to 2-quinaldine **1d** afforded the corresponding alcohol **11** (as reported in (5)), whereas Wittig and Wittig-Horner reactions with **1d** gave rise to the expected vinylic derivatives **10** and **22** (as reported by (24)). The alkynyl derivatives **13-16** were obtained through the

palladium catalyzed coupling reaction between the corresponding alkynes and the required 2- and 3-halogenated quinolines **1e** and **1f**. Then compound **19** was obtained by TBAF treatment of **14**. N-oxides **20** and **21** were obtained by H₂O₂ oxidation of the corresponding compounds **1g** and **1h**. Aldehyde **23** was obtained by reduction of ester **22**, whereas alcohol **12** was obtained by Dibal reduction of **23**. All spectroscopic data of the synthesized products were in agreement with the proposed structures. Chemical structures of quinolines evaluated in this study are shown in **Figure 1**. They were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and sterilized by gamma irradiation at dose of 65000 rads and stored at -20° C until use.

Cell cultures PBMC were obtained by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Pharmacia, Biotech Uppsala, Sweden) from heparinized venous blood. To evaluate the cell toxicity of quinolines, PBMC from healthy controls were first stimulated for three days with 2 µg/ml purified phytohaemagglutinin (PHA) and subsequently cultured with 2 U/ml human recombinant IL-2 (2 U/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) in RPMI 1640 medium supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 % non essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin and 5 % human AB serum (all provided by Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), for five days.

Cellular Toxicity assays

Trypan Blue. Toxicity tests were performed using PBMC from three different healthy controls and PBMC from three HTLV-1infected individuals. 1 x 10⁵ cells/well were culture in triplicate, in 96-well U-bottom culture plates (Costar, Cambridge, MA), in presence of three concentrations of quinolines (10 µM, 50 µM, and 100 µM) for 3 days,

at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Cells were counted using a light microscope (Nikon-Model Labophot-2, Japan). To determine the percentage of viable cells, the number of unstained cells were divided by the total number of cells and then multiplied by 100. The cellular viability of at least 85% was considered to indicate a non-toxic compound. This value was stipulated taking into account the mean cellular viability of non-infected cells in the presence of media, without drugs, which was 97 ± 4% of viable cells.

XTT Assay. PBMC were plated in 96-well plates at 1x10⁵ cells per well. Serial dilutions of compounds were added to the wells. Final concentration of DMSO in all wells was at 1%, in a total volume of 200 µl. The plates were maintained in a 37 °C incubator. After 3 days, 50 µl of XTT-PMS solution (20 µM) was added to each well. Then, the plate was incubated at 37°C for 4 h. The optical density (OD) was determined by V-max photometer (Molecular Devices, Inc., Menlo Park, CA) at a test wavelength of 450 nm. The toxicity represents the ratio of OD of a well in presence of quinolines with the OD of control wells in presence of medium containing DMSO. The cellular viability of at least 85% was considered to indicate a non-toxic compound.

Cellular proliferation assay. To evaluate the effects of quinoline compounds on cellular proliferation, PBMC from HTLV-infected patients were cultured in supplemented RPMI 1640 culture medium with 5% AB serum, in 96-well U-bottom culture plates (Costar, Cambridge, MA), in triplicate, at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Briefly, 1 x 10⁵ cells/well were cultured in the presence of serial dilutions (100 at 0,8 µM) of quinolines. After 5 days of culture, cells were pulsed overnight with 1 µCi 3H-thymidine (specific activity 2 Ci/mmole; ICN, Costa Mesa, CA). Incorporated

³H-thymidine was measured with a liquid scintillation beta counter (Direct Beta Counter, Matrix 9600 - Packard). Results were expressed as mean counts per minute. The stimulation index (SI) represents the ratio of mean counts obtained in the presence of quinolines and mean counts obtained without quinolines. Percent inhibition was determined by comparing cell counts in wells containing compounds to those in wells containing cell cultured with medium.

Statistical analyses. Correlation between continuous variables was examined by Spearman test. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Cellular toxicity of quinoline compounds

Cellular viability of PBMC from healthy controls cultured in presence of quinoline compounds **2-23** were assessed by both Blue Trypan and XTT methods. From 22 compounds assessed, thirteen were non-toxic in all tested concentration (**3, 5, 8-11, 14-18, 19-21, 23**). One was non-toxic at 50 and 10 μ M (**7**), and four were non-toxic only at 10 μ M (**2, 4, 6, and 22**). **12** and **13** had high toxicity in all tested concentrations.

There was a straight correlation between viability assessed by Trypan Blue and XTT methods for all drugs at all tested concentrations (**Figure 2**).

Inhibitory effect of quinolines on PBMC from HTLV-1-infected individuals

To estimate the inhibitory effect of quinolines on PBMC from HTLV-1-infected individuals, we first performed a kinetic of spontaneous proliferation with these cells. PBMC from HTLV-1 infected individuals had a higher level of cell proliferation after 4 and 5 days of culture. The mean proliferation at day 1 was 64.5 ± 90.3 cpm, at day 2 was 720.5 ± 1021.3 cpm, at day 3 was 1309 ± 1011.8 cpm, at day 4 was 3704.2 ± 2810.9 cpm and reached 4582.8 ± 3144 cpm after 5 days culture. In contrast, the mean proliferation of PBMC from non-infected individuals was only 107 ± 97 cpm after 5 days culture (data not shown)

Then, we tested the inhibitory capacity of compounds on spontaneous proliferation of PBMC from HTLV-1-infected patients. Twenty compounds at non-toxic concentrations were evaluated: **2-6, 7, 8, 9, 10, 11, 14-16, 17, 18, 19, 20, 21 and 22** (**Table 1**). Six compounds had a capacity to inhibit more than 70% of the spontaneous proliferation: **5-7, 10, 20 and 23**, as shown in **Figure 3**. The compound **7**

had the highest inhibitory effect on spontaneous proliferation of PBMC from HTLV-1 infected individuals (96% at 25 μ M), compounds **5** and **6** had the lowest inhibitory effect: 71 % at 100 μ M and 50 μ M, respectively. For two compounds (**5** and **10**) we observed, at the lowest concentration (0.8 μ M), a weak inhibitory effect on spontaneous proliferation.

Moreover, the inhibitory effect of quinoline compounds on spontaneous proliferation of PBMC from HTLV-1 infected individuals was not due to toxicity. Indeed, the cellular viability in presence of the higher concentration of quinoline compounds was similar to the cellular viability in presence of medium, as shown in **Figure 4**.

DISCUSSION

In our study, we identified six new quinoline compounds with inhibitory activity on spontaneous proliferation of PBMC from HTLV-1-infected individuals *in vitro*. One compound, **7**, had high anti-proliferative effect (up to 70%) at 50, 25 and 12.5 μ M and compounds **6** had an anti-proliferative effect (up to 50%) at 25, 12.5 and 6.3 μ M. The other compounds were active at 100 μ M, with 40 to 70% mean inhibition on PBMC proliferation. A previous study, in which 29 quinolines compounds were assessed, three compounds had higher inhibitory activity than the quinolines of our study, mean of 85% at 10 μ M (12), among which, compounds **20** (2-N-oxy-2-styrylquinoline) and **7** (8-hydroxy-2-(2-hydroxypropyl) quinoline) were two of the most active compounds of our study. However, in that study, the compounds were tested in HTLV transformed cell lines. This apparent discrepancy could be due to the fact that quinoline compounds

could use different pathways to inhibit cellular proliferation of PBMC from HTLV-infected individuals or cell lines.

Spontaneous proliferation induced by HTLV infection is due, in part, to an IL-2/IL-2R autocrine loop. It was shown that the addition of monoclonal antibodies against IL-2 or IL-2R alpha partially inhibited the spontaneous proliferation. The same was observed with IL-15 and its receptor. Experiments using anti-IL-15 or anti IL-15-receptor antibodies inhibit the spontaneous proliferation in PBMC of HTLV infected individuals (2). The mechanisms involved in the inhibition of spontaneous proliferation by the quinoline compounds are not clear. The quinolines are potent inhibitors of the HIV integrase enzyme (25). However, the action of the quinolines in the HTLV integrase enzyme is not described. Therefore, further studies are necessary to elucidate the action mechanisms of these drugs. Particularly, the effect of quinoline compounds on cytokine production such as IL-2, IL-10, TNF- α and IFN- γ on the HTLV proviral load should be evaluated.

In conclusion, our results clearly indicated that **5**, **6**, **7**, **10**, **20** and **23** have capacity to inhibit, *in vitro*, spontaneous proliferation of PBMC from HTLV-1-infected individuals.

ACKNOWLEDGEMENTS

Support for this study was provided by the Fundação de Amparo a Pesquisa da Bahia (FAPESB). We thank Ms Fabiola Nascimento da Conceição for reading the manuscript.

REFERENCES

1. **Azran, I., Y. Schavinsky-Khrapunsky, and M. Aboud.** 2004. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology* **1**:20.
2. **Benbrik, E., P. Chariot, S. Bonavaud, M. Ammi-Said, E. Frisdal, C. Rey, R. Gherardi, and G. Barlovatz-Meimon.** 1997. Cellular and mitochondrial toxicity of zidovudine (AZT), didanosine (ddI) and zalcitabine (ddC) on cultured human muscle cells. *J Neurol Sci* **149**:19-25.
3. **Dourado, I., L. C. Alcantara, M. L. Barreto, M. da Gloria Teixeira, and B. Galvao-Castro.** 2003. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* **34**:527-31.
4. **Edlich, R. F., J. A. Arnette, and F. M. Williams.** 2000. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *J Emerg Med* **18**:109-19.
5. **Fakhfakh, M. A., A. Fournet, E. Prina, J. F. Mouscadet, X. Franck, R. Hocquemiller, and B. Figadere.** 2003. Synthesis and biological evaluation of substituted quinolines: potential treatment of protozoal and retroviral co-infections. *Bioorg Med Chem* **11**:5013-23.
6. **Fakhfakh, M. A., X. Franck, P. Duret, A. Fournet, R. Hocquemiller, and F. B.** 2001. Expeditive preparation of 2-substituted quinolines. *Tetrahedron Lett* **42**:3847-3850.
7. **Fakhfakh, M. A., X. Franck, A. Fournet, R. Hocquemiller, and B. Figadere.** 2002. Preparation of quinolines substituted at the 2- or 3-position by an alkenyl or alkynyl chain. *Synth. Comm* **32**:2863-2875.
8. **Fournet, A., A. A. Barrios, V. Munoz, R. Hocquemiller, A. Cave, and J. Bruneton.** 1993. 2-substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:859-63.
9. **Fournet, A., M. E. Ferreira, A. Rojas De Arias, S. Torres De Ortiz, S. Fuentes, H. Nakayama, A. Schinini, and R. Hocquemiller.** 1996. 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* **40**:2447-51.
10. **Fournet, A., R. Mahieux, M. A. Fakhfakh, X. Franck, R. Hocquemiller, and B. Figadere.** 2003. Substituted quinolines induce inhibition of proliferation of HTLV-1 infected cells. *Bioorg Med Chem Lett* **13**:891-4.
11. **Franck, X., A. Fournet, E. Prina, R. Mahieux, R. Hocquemiller, and B. Figadere.** 2004. Biological evaluation of substituted quinolines. *Bioorg Med Chem Lett* **14**:3635-8.
12. **Gantier, J. C., A. Fournet, M. H. Munos, and R. Hocquemiller.** 1996. The effect of some 2-substituted quinolines isolated from *Galipea longiflora* on *Plasmodium vinckei petteri* infected mice. *Planta Med* **62**:285-6.
13. **Gessain, A., F. Barin, J. C. Vernant, O. Gout, L. Maurs, A. Calender, and G. de The.** 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* **2**:407-10.
14. **Heraud, J. M., F. Mortreux, F. Merien, H. Contamin, R. Mahieux, J. F. Pouliquen, E. Wattel, A. Gessain, H. de The, A. Bazarbachi, O. Hermine, and M. Kazanji.** 2006. The efficacy of combined therapy of arsenic trioxide and alpha interferon in human T-cell leukemia virus type-1-infected squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *Antiviral Res* **70**:132-9.

15. **Hinuma, Y., K. Nagata, M. Hanaoka, M. Nakai, T. Matsumoto, K. I. Kinoshita, S. Shirakawa, and I. Miyoshi.** 1981. 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* **78**:6476-80.
16. **Ijichi, S., T. Matsuda, I. Maruyama, T. Izumihara, K. Kojima, T. Niimura, Y. Maruyama, S. Sonoda, A. Yoshida, and M. Osame.** 1990. Arthritis in a human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) carrier. *Ann Rheum Dis* **49**:718-21.
17. **Kashala, O., R. Marlink, M. Ilunga, M. Diese, B. Gormus, K. Xu, P. Mukeba, K. Kasongo, and M. Essex.** 1994. 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* **169**:296-304.
18. **Kataoka, A., H. Imai, S. Inayoshi, and T. Tsuda.** 1993. Intermittent high-dose vitamin C therapy in patients with HTLV-I associated myelopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **56**:1213-6.
19. **Kitajima, I., I. Maruyama, Y. Maruyama, S. Ijichi, N. Eiraku, Y. Mimura, and M. Osame.** 1989. Polyarthritis in human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Arthritis Rheum* **32**:1342-4.
20. **Kramer, A., S. Jacobson, J. F. Reuben, E. L. Murphy, S. Z. Wiktor, B. Cranston, J. P. Figueroa, B. Hanchard, D. McFarlin, and W. A. Blattner.** 1989. Spontaneous lymphocyte proliferation in symptom-free HTLV-I positive Jamaicans. *Lancet* **2**:923-4.
21. **LaGrenade, L., B. Hanchard, V. Fletcher, B. Cranston, and W. Blattner.** 1990. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet* **336**:1345-7.
22. **Madeleine, M. M., S. Z. Wiktor, J. J. Goedert, A. Manns, P. H. Levine, R. J. Biggar, and W. A. Blattner.** 1993. HTLV-I and HTLV-II world-wide distribution: reanalysis of 4,832 immunoblot results. *Int J Cancer* **54**:255-60.
23. **Marinho, J., B. Galvao-Castro, L. C. Rodrigues, and M. L. Barreto.** 2005. Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case-control study. *J Acquir Immune Defic Syndr* **40**:625-8.
24. **Martinez-Grueiro, M., C. Gimenez-Pardo, A. Gomez-Barrio, X. Franck, A. Fournet, R. Hocquemiller, B. Figadere, and N. Casado-Escribano.** 2005. Nematocidal and trichomonocidal activities of 2-substituted quinolines. *Farmacologia* **60**:219-24.
25. **Mascarenhas, R. E., C. Brodskyn, G. Barbosa, J. Clarencio, A. S. Andrade-Filho, F. Figueiroa, B. Galvao-Castro, and F. Grassi.** 2006. 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* **13**:547-52.
26. **Mekouar, K., J. F. Mouscadet, D. Desmaele, F. Subra, H. Leh, D. Savoure, C. Auclair, and J. d'Angelo.** 1998. Styrylquinoline derivatives: a new class of potent HIV-1 integrase inhibitors that block HIV-1 replication in CEM cells. *J Med Chem* **41**:2846-57.
27. **Mochizuki, M., K. Yamaguchi, K. Takatsuki, T. Watanabe, S. Mori, and K. Tajima.** 1992. HTLV-I and uveitis. *Lancet* **339**:1110.
28. **Morgan, O. S., P. Rodgers-Johnson, C. Mora, and G. Char.** 1989. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet* **2**:1184-7.

29. **Nakayama, H., M. E. Ferreira, A. Rojas de Arias, N. Vera de Bilbao, S. Torres, A. Schinini, and A. Fournet.** 2001. Experimental treatment of chronic Trypanosoma cruzi infection in mice with 2-n-propylquinoline. *Phytother Res* **15**:630-2.
30. **Osame, M., K. Usuku, S. Izumo, N. Ijichi, H. Amitani, A. Igata, M. Matsumoto, and M. Tara.** 1986. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* **1**:1031-2.
31. **Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo.** 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**:7415-9.
32. **Popovic, M., N. Flomenberg, D. J. Volkman, D. Mann, A. S. Fauci, B. Dupont, and R. C. Gallo.** 1984. Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-I or HTLV-II. *Science* **226**:459-62.
33. **Porto, A. F., F. A. Neva, H. Bittencourt, W. Lisboa, R. Thompson, L. Alcantara, and E. M. Carvalho.** 2001. HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis. *Parasite Immunol* **23**:503-7.
34. **Prince, H. E., J. York, S. M. Owen, and R. B. Lal.** 1995. 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* **102**:256-61.
35. **Setoguchi, Y., S. Takahashi, T. Nukiwa, and S. Kira.** 1991. Detection of human T-cell lymphotropic virus type I-related antibodies in patients with lymphocytic interstitial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* **144**:1361-5.
36. **Uchiyama, T., J. Yodoi, K. Sagawa, K. Takatsuki, and H. Uchino.** 1977. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **50**:481-92.
37. **Vrielink, H., and H. W. Reesink.** 2004. HTLV-I/II prevalence in different geographic locations. *Transfus Med Rev* **18**:46-57.
38. **Zouhiri, F., J. F. Mouscadet, K. Mekouar, D. Desmaele, D. Savoure, H. Leh, F. Subra, M. Le Bret, C. Auclair, and J. d'Angelo.** 2000. 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* **43**:1533-40.

Figure.1

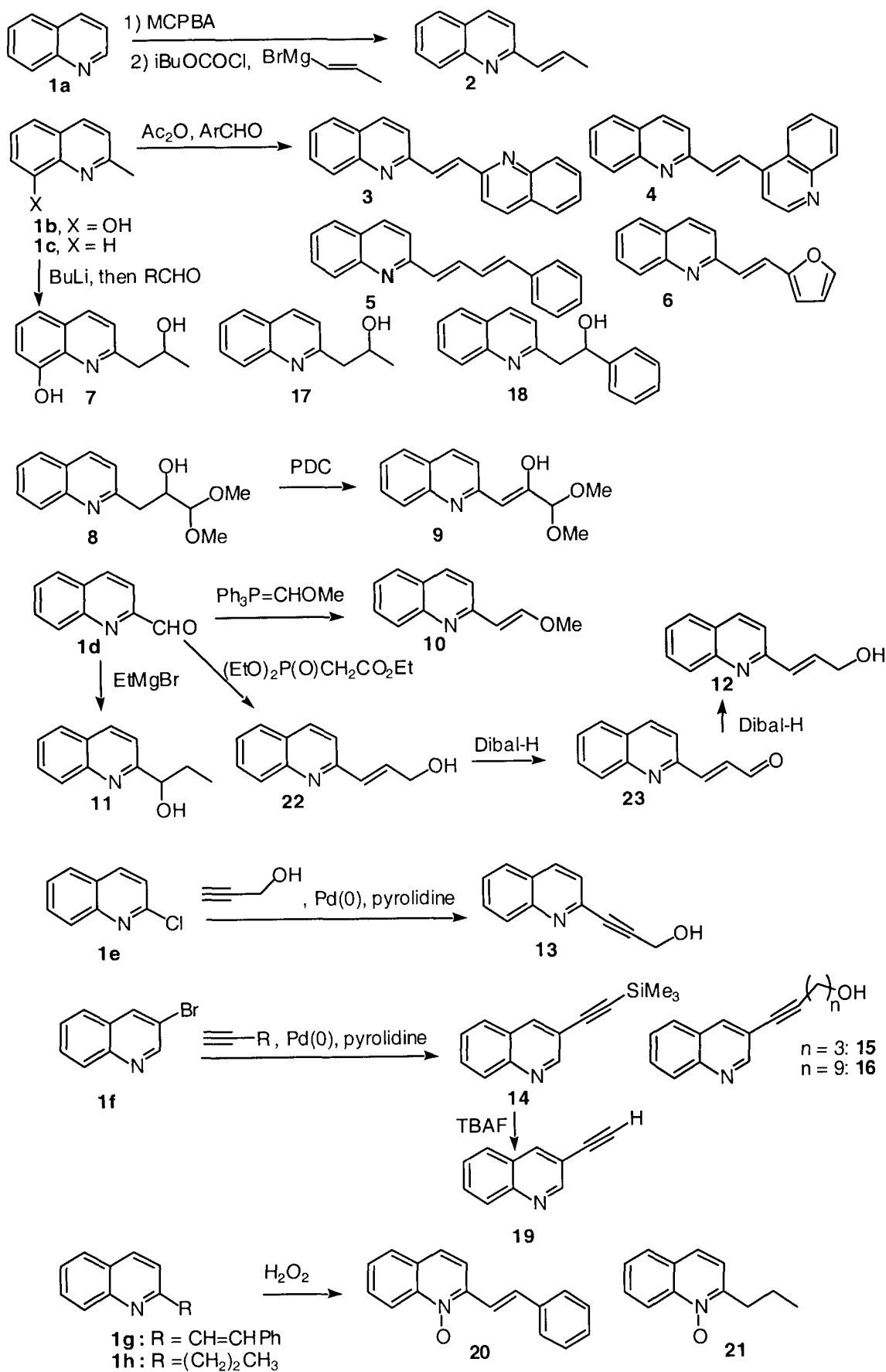


Figure.2

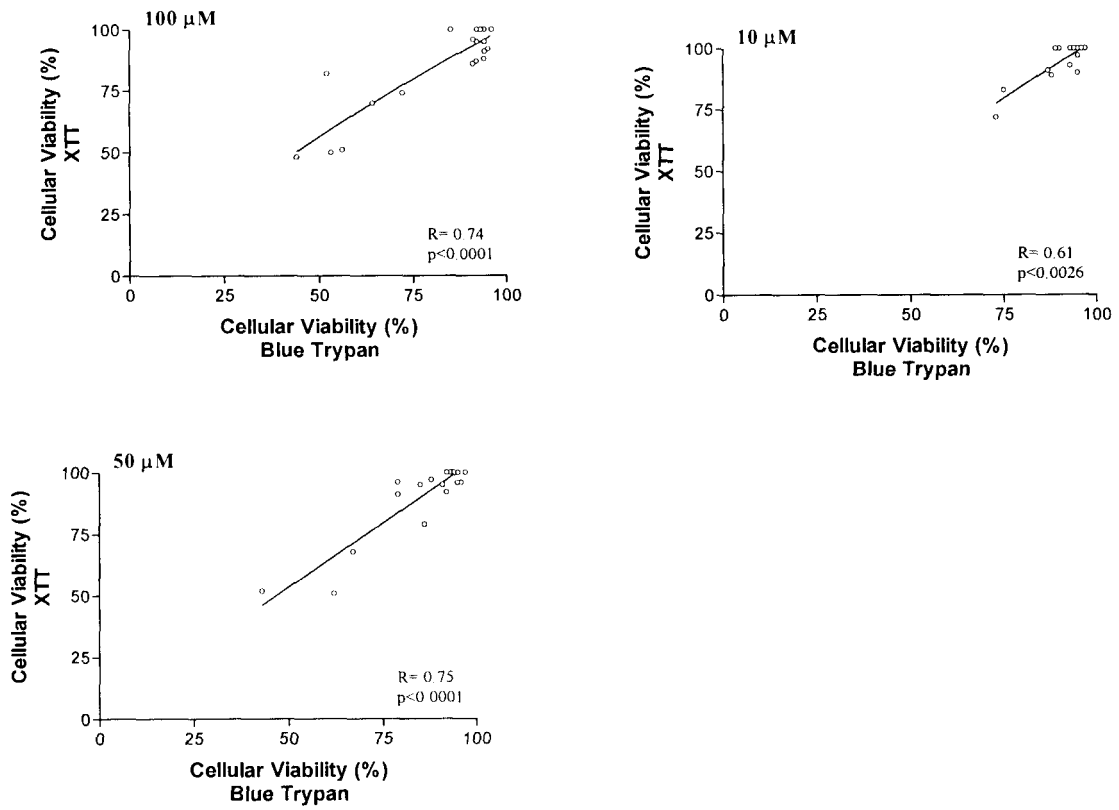


Table 1. Antiproliferative activity of quinolines **2-23** against PBMC from HTLV-1-infected individuals

Comp	Inhibition (%)	Comp	Inhibition (%)
2	50 μ M: 3	14	50 μ M: 43
3	50 μ M: 56	15	100 μ M: 30
4	10 μ M: 0	16	100 μ M: 52
5	100 μ M: 71	17	100 μ M: 38
6	25 μ M: 71	18	100 μ M: 53
7	25 μ M: 96	19	100 μ M: 38
8	100 μ M: 10	20	100 μ M: 84
9	100 μ M: 0	21	100 μ M: 44
10	100 μ M: 86	22	12.5 μ M: 46
11	100 μ M: 10	23	100 μ M: 90

Figure.3

Figure.3 (continuation)

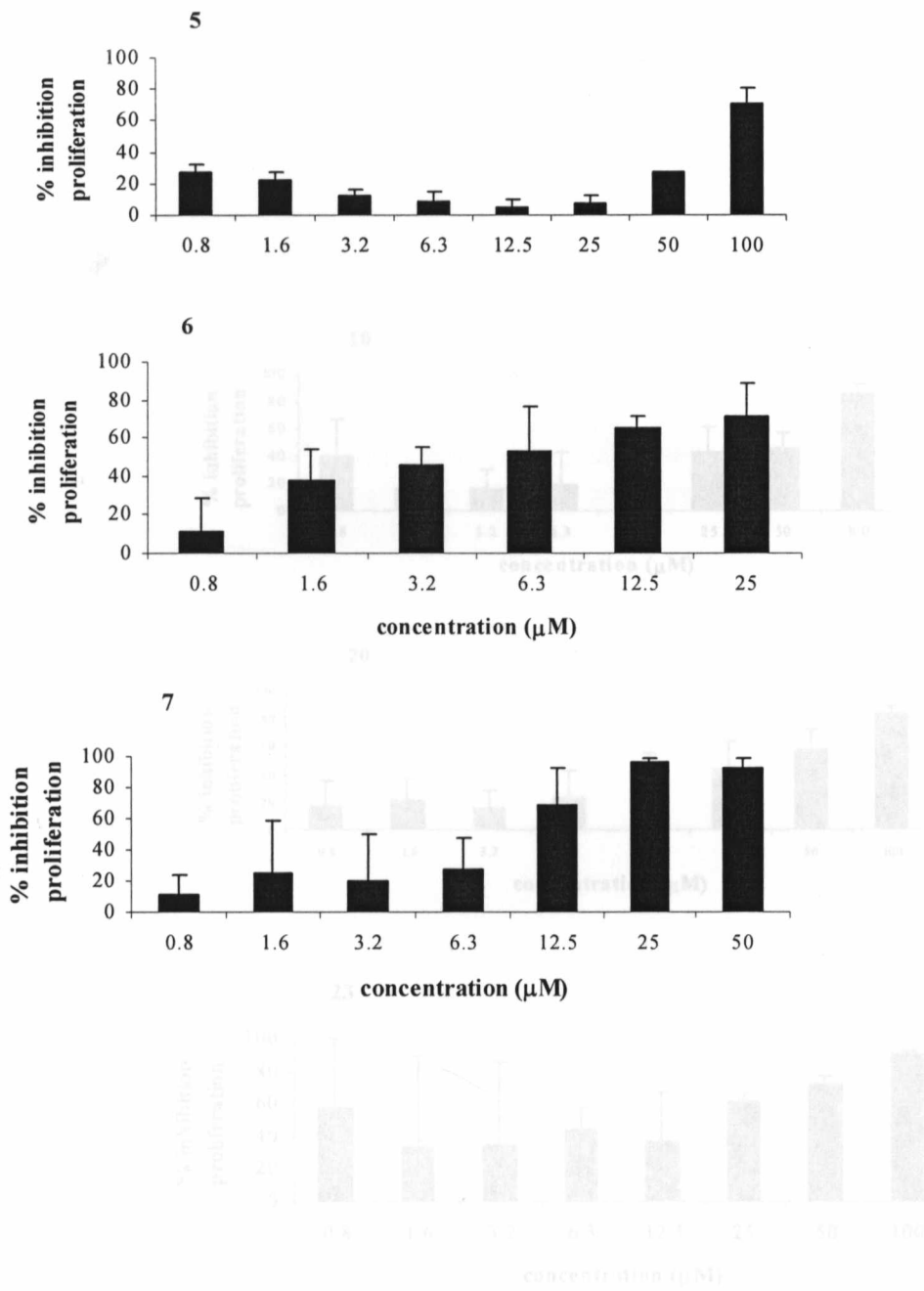


Figure.3 (continuation)

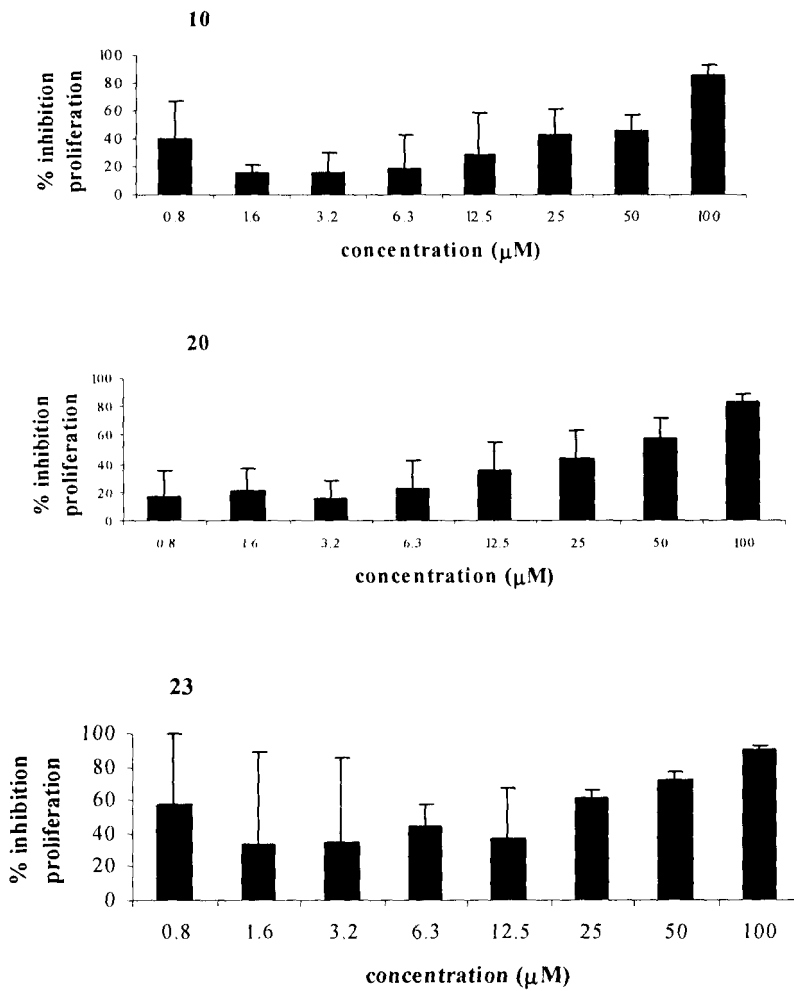


Figure.4

Figure 1. Chemical structure of quinoline compounds.

Figure 2. Correlation between cellular viability obtained by Hae-Trypan (viable cells) and XTT methods (optical density). Twenty-two quinoline compounds were evaluated through XTT (absorbance) at concentrations of 100 nM, 50 nM and 10 nM. Each point represents the compound or the concentration. Statistical significance ($p < 0.005$).

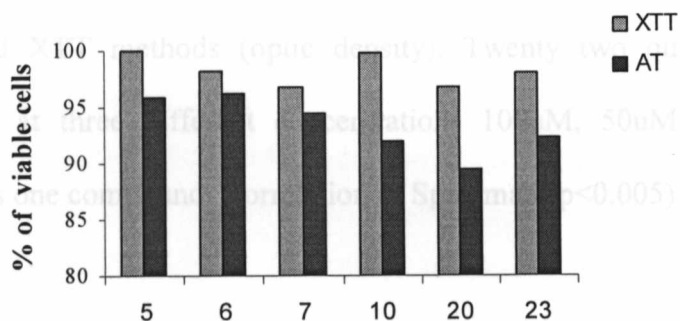


Figure 3. Inhibition of spontaneous proliferation of PBMC from HTLV-I-infected patients by quinolines 5, 7, 10, 20 and 23. Data are representatives of media of inhibition from three patients. PBMC from HTLV-I-infected individuals were cultured in presence or absence of quinolines by 5 days.

Figure 4. Cellular viability of PBMC from HTLV-I-infected patients cultured in presence of quinoline compounds (5, 6, 7, 10, 20, 23) assessed by XTT and Trypan blue methods.

LEGENDS

Figure 1 Chemical structure of quinolines compounds.

Figure 2. Correlation between cellular viability obtained by Blue Trypan (% viable cells) and XTT methods (optic density). Twenty two quinoline compounds were evaluated at three different concentrations 100uM, 50uM and 10uM. Each point represents one compound. Correlation of Spearman ($p < 0.005$)

Figure 3. Inhibition of spontaneous proliferation of PBMC from HTLV-I-infected patients, by quinolines **5-7, 10, 20** and **23**. Data are representatives of media of inhibition from three patients. PBMC from HTLV-I-infected individuals were cultured in presence or absence of quinolines by 5 days.

Figure 4. Cellular viability of PBMC from HTLV-I-infected patients cultured in presence of quinoline compounds (**5, 6, 7, 10, 20, 23**) assessed by XTT and Trypan blue methods

6. Discussão

A proliferação espontânea é uma das alterações mais características da infecção pelo HTLV-1, e é observada na maioria dos indivíduos infectados. Linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória são as células envolvidas na proliferação espontânea de indivíduos infectados por este vírus (Prince, York et al. 1995). Este fenômeno tem sido descrito tanto em pacientes com HAM/TSP, quanto em indivíduos assintomáticos (Kramer, Jacobson et al. 1989). Alguns estudos sugerem que a proliferação espontânea seja mais intensa nos pacientes com HAM/TSP que em assintomáticos (Santos, Porto et al. 2004)(Itoyama, Minato et al. 1988).

Ao quantificarmos as proporções de linfócitos T no sangue periférico dos indivíduos infectados pelo HTLV-1, identificamos um aumento na proporção dos linfócitos T CD4⁺ de memória, expressando CD45RO. Este aumento apresentou uma correlação direta com a intensidade de proliferação nestes indivíduos ($r_s=0.37$, $p=0.04$). Os linfócitos T de memória, CD45RO⁺ são os responsáveis pelo reconhecimento aos antígenos de memória. Além disso, como principais reservatórios do vírus, estas células poderiam ser especialmente influenciadas pela atividade pleiotrópica da proteína Tax, induzindo sua expansão e proliferação (Richardson, Edwards et al. 1990; Holisberg 1999; Azran, Schavinsky-Khrapunsky et al. 2004). Análises do repertório do TCR-V β revelaram expansão clonal de linfócitos T CD4⁺, apenas entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1 com proliferação espontânea. Tem sido sugerido que a expansão dos linfócitos T CD4⁺ é um resultado direto da infecção pelo HTLV-1 (Eiraku, Hingorani et al. 1998).

A observação mais importante de nosso estudo é a diminuição dos índices de estimulação aos antígenos de memória nos indivíduos infectados, especialmente entre aqueles sem proliferação espontânea. A ausência de resposta linfoproliferativa detectável aos antígenos, nos indivíduos com

proliferação espontânea era esperada, uma vez que estes apresentam níveis elevados de proliferação na ausência de estímulo. No entanto, a demonstração de hiporresponsividade e anergia aos antígenos do *Mycobacterium tuberculosis*, nos portadores do HTLV-1, reforçam nossos achados (Tachibana, Okayama et al. 1988; Murai, Tachibana et al. 1990; Welles, Tachibana et al. 1994; Suzuki, Dezzutti et al. 1999). Estes estudos, demonstraram que indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam uma redução de resposta ao teste intradérmico da tuberculina (PPD) (Tachibana, Okayama et al. 1988; Murai, Tachibana et al. 1990; Welles, Tachibana et al. 1994; Suzuki, Dezzutti et al. 1999). Uma incapacidade, *in vitro*, das células de indivíduos infectados em produzir IFN- γ em resposta ao PPD foi igualmente observada (Suzuki, Dezzutti et al. 1999). Estes autores demonstram, ainda, que esta resposta não é restaurada pela adição de IL-12 e anti-IL-4 (Suzuki, Dezzutti et al. 1999). Estes resultados sugerem alterações funcionais nas populações celulares envolvidas na hipersensibilidade tipo tardia, tais como os linfócitos T CD4 helper de memória e linfócitos T citotóxicos específicos, os quais mediam este tipo de resposta. Em nosso estudo, observamos uma redução de resposta aos antígenos de memória, inclusive naqueles indivíduos que não apresentavam proliferação espontânea. Nestes últimos indivíduos, observamos uma diminuição significativa nos índices de estimulação com três dos quatro antígenos testados (candidina, PPD, e TT). Além disso, estes indivíduos reconhecem um número menor de antígenos, comparado aos controles não infectados. Enquanto 83% dos indivíduos não infectados são capazes de reconhecer três ou mais antígenos, apenas 33% dos infectados sem proliferação espontânea, o fazem.

Estes resultados sugerem uma disfunção dos linfócitos T na infecção pelo HTLV-1, independentemente da presença de proliferação espontânea. Entretanto, os mecanismos envolvidos na disfunção destas células em indivíduos infectados, sem proliferação espontânea não está esclarecido. É possível que estes mecanismos sejam distintos entre indivíduos infectados com e sem proliferação.

A infecção pelo HTLV-1 induz uma ativação do sistema imune, e os linfócitos T de indivíduos infectados apresentam um aumento na expressão de

moléculas de ativação, como CD25 e HLA-DR (Popovic, Flomenberg et al. 1984; Romero, Prevost et al. 2000). Nossos resultados mostram igualmente alterações no perfil de ativação dos linfócitos T de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Assim como descrito na literatura, os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ dos indivíduos com HAM/TSP apresentaram perfil de ativação. No entanto, entre os assintomáticos, as freqüências na expressão da maioria das moléculas estudadas foram similares às encontradas em pacientes com HAM/TSP. Analisando os grupos estudados, no contexto da presença de proliferação espontânea, estas alterações foram marcadamente presentes naqueles indivíduos com proliferação, embora muitas vezes também observadas na ausência de proliferação espontânea. Em nosso estudo, observamos que os indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentaram uma elevada freqüência de linfócitos T CD4⁺ expressando as moléculas CD69 e HLA-DR, moléculas tipicamente expressas em células T ativadas. Um aumento na expressão de CD25 foi igualmente observado, especialmente na subpopulação de memória T CD4⁺CD45RO⁺. Freqüências elevadas na expressão de CD25 e HLA-DR em linfócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 são amplamente descritos na literatura (Popovic, Flomenberg et al. 1984; Romero, Prevost et al. 2000). Um aumento na expressão da molécula CD69 também foi descrito em linfócitos T CD4⁺ de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (Al-Fahim, Cabre et al. 1999; Yamano, Takenouchi et al. 2005). Por outro lado, observamos uma redução da freqüência de linfócitos T CD4⁺ expressando CD62L, um marcador de migração de células virgens para os linfonodos. É possível que a redução na expressão desta molécula, associada ao aumento na proporção de linfócitos T CD4⁺ expressando CD45RO⁺, influenciem o aumento na proporção de linfócitos T de memória, e conseqüente diminuição de células virgens, devido a persistência do HTLV-1.

Assim como observado para os linfócitos T CD4⁺, a avaliação do perfil de ativação nos linfócitos T CD8⁺ revelou um aumento na expressão de CD69 e diminuição de CD62L. Uma redução na freqüência de linfócitos expressando CD28 foi observada em indivíduos infectados apresentando proliferação espontânea. Além disso, esta redução foi inversamente proporcional à intensidade

de proliferação nestas células. A diminuição na expressão de CD28 em linfócitos T CD8⁺ foi descrita entre os pacientes com HAM/TSP (Brito-Melo, Martins-Filho et al. 2002). A redução na expressão de CD28 tem sido descrita em infecções crônicas como esquistossomose, doença de Chagas, e na infecção pelo HIV (Caruso, Cantalamessa et al. 1994; Dutra, Martins-Filho et al. 1996; Martins-Filho, Cunha-Melo et al. 1999). A molécula CD28 é uma molécula co-estimulatória presente em linfócitos T que interage com B7, em células apresentadoras de antígeno, gerando o sinal estimulatório para a ativação celular. O bloqueio deste sinal pode induzir anergia. Além disso, a molécula CTLA-4, também expressa em linfócitos T, liga-se igualmente às moléculas B7, nas células de apresentadoras de antígeno, gerando um sinal inibitório. É possível que a redução na expressão de CD28 seja reflexo de uma tentativa do sistema imune em reduzir a intensidade da ativação celular.

Confrontando nossos resultados, que revelam ativação dos linfócitos T independente da presença de proliferação espontânea de PBMC, com os resultados da literatura, nos quais estas observações são descritas especialmente em indivíduos com HAM/TSP, podemos supor que a ativação seja um evento precoce, presente na maioria dos indivíduos infectados, que precede o surgimento de doença.

A proporção de linfócitos T que espontaneamente produz IFN- γ foi maior na subpopulação T CD4⁺ dos indivíduos infectados que nos indivíduos controles. Este aumento foi estatisticamente significativo apenas nos indivíduos com proliferação espontânea, embora aqueles sem proliferação tenham apresentado a mesma tendência. Em relação à sintomatologia, tanto pacientes com HAM/TSP, quanto assintomáticos, apresentaram freqüências elevadas de linfócitos T CD4⁺ positivos para IFN- γ . Na população de linfócitos T CD8⁺, embora um aumento discreto tenha sido observado nos indivíduos infectados, observamos uma correlação positiva entre os níveis de proliferação e a freqüência de células produtoras de IFN- γ . Um aumento da produção desta citocina em PBMC total, tanto em indivíduos com HAM/TSP, quanto assintomáticos (Santos, Porto et al.

2004), e uma frequência elevada de linfócitos T CD4+ (Goon, Hanon et al. 2002) e T CD8+ (Kubota, Kawanishi et al. 1998) produtores de IFN- γ em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP tem sido observada. Nossos resultados, embora preliminares, sugerem que a ativação de linfócitos T ocorre independente da presença de sintomas clínicos, como HAM/TSP, e da presença de proliferação espontânea. No entanto, o número de indivíduos estudados necessita ser ampliado, para que nossos resultados permitam conclusões consistentes.

A infecção pelo HTLV-1 induz uma ativação crônica do sistema imune (Buckle, Hafler et al. 1996)(Hollsberg 1999). Esta ativação ocorre de maneira específica e inespecífica. Um aumento na expressão de moléculas de adesão pode promover a ativação de células T de repouso, não infectadas (Buckle, Hafler et al. 1996). De fato, a expressão aumentada de moléculas de ativação como CD54, CD40 e CD80 (Dezzutti, Rudolph et al. 1995) em PBMC recém isolados, indicam uma ativação *in vivo*, mesmo em células não infectadas (Jacobson, Raine et al. 1988; Itoyama, Kira et al. 1989). A ativação persistente dos linfócitos T, encontrada inclusive nos indivíduos sem proliferação espontânea, pode resultar em um estado de imunossupressão.

Na infecção pelo HIV-1, a anergia dos linfócitos T CD4+ precede a perda quantitativa destas células. Inicialmente, ocorre uma incapacidade destas células em responder aos antígenos virais, em seguida, aos antígenos de memória, e por fim, aos mitógenos (Lane, Masur et al. 1985; Clerici, Stocks et al. 1989; Clerici, Hakim et al. 1993). A perda seletiva dos linfócitos de memória; um déficit Th1, especialmente decorrente da redução nos níveis de IL-2 (Murray, Rubin et al., 1984); uma diminuição na produção de IL-12, pelas células apresentadoras de antígeno (Clerici, Hakim et al. 1993) e uma diminuição da expressão de moléculas co-estimulatórias, especialmente CD28 (Caruso, Cantalamessa et al. 1994), são mecanismos que podem explicar a disfunção dos linfócitos T CD4+ na infecção pelo HIV.

Na infecção pelo HTLV-1, observamos uma elevada produção de IL-2, porém outros fatores como alterações quantitativas e funcionais em células T

regulatórias (Treg) (Yamano, Takenouchi et al. 2005)(Iwashiro, Messer et al. 2001), e em células dendríticas (DCs) (Macatonia, Cruickshank et al. 1992), bem como a incapacidade em responder a IL-12 (Suzuki, Dezzutti et al. 1999), poderiam induzir uma anergia dos linfócitos T.

Uma disfunção em células T regulatórias, T CD4⁺CD25⁺, foi observada em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com HAM/TSP (Yamano, Takenouchi et al. 2005). Uma diminuição na expressão do mRNA e da proteína Foxp3, e na expressão de moléculas importantes na função regulatória, como CTLA-4 e GITR, foi demonstrada (Yamano, Takenouchi et al. 2005). A proteína Foxp3 é um fator de transcrição presente na subpopulação de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ que ocorre naturalmente, de origem tímica (Nielsen, Lindebo et al., 2004; Holm, Nielsen et al., 2004). As células T CD4⁺CD25⁺ de indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram incapazes de inibir a proliferação, após estímulo, de células T CD4⁺CD25⁻ de indivíduos não infectados (Yamano, Takenouchi et al. 2005). Estes achados apontam para um comprometimento da função T regulatória na infecção por este vírus. No entanto, o estudo da influência de outras populações de linfócitos T regulatórios, de origem e fenótipos distintos, poderia contribuir para o conhecimento da disfunção imune nesta infecção. A depleção de DCs, e a manutenção de culturas de populações purificadas de linfócitos T CD4 e CD8, isoladamente, abole a linfoproliferação espontânea na infecção por este vírus (Macatonia, Cruickshank et al. 1992). A reposição de DC, mas não de linfócitos B e macrófagos, restaura a proliferação espontânea que é bloqueada por anti-MHC de classe II. Estes resultados sugerem uma contribuição importante das DCs na intensa ativação celular encontrada na infecção pelo HTLV-1. Assim, a apresentação de antígenos do HTLV para linfócitos T autólogos, por DC infectadas, resulta em uma proliferação anormal de linfócitos T e conseqüente inflamação (Macatonia, Cruickshank et al. 1992). Uma redução na proporção de DCs é observada em indivíduos infectados pelo HIV-1 (Grassi, Hosmalin et al. 1999). Resultados preliminares obtidos por nossa equipe apontam igualmente para uma redução na proporção de células dendríticas na infecção pelo HTLV-1 (Grassi et al., 2005 Virus Reviews & Research XVI National Meeting of Virology,

Nov, 2005, Vol.10 – Supplement 1, P359, pag 182). Adicionalmente, a anergia ao PPD, como consequência da incapacidade em responder a IL-12 sugere a existência de uma disfunção dos linfócitos T na infecção pelo HTLV-1 (Suzuki, Dezzutti et al. 1999).

Além disso, considerando a importância dos linfócitos T CD4+ na geração e manutenção da atividade citotóxica dos linfócitos T CD8, a infecção destas células pelo HTLV-1 pode interferir na via normal da resposta imune antiviral (Buckle, Hafler et al. 1996).

Uma das principais limitações do nosso estudo é ter sido realizado em um modelo transversal. Um estudo longitudinal, acompanhando pacientes sem proliferação espontânea, assintomáticos, no qual a avaliação da proliferação espontânea, da resposta aos antígenos de memória, da quantificação de subpopulações de linfócitos T, e avaliação do perfil de ativação, pudessem ser realizados em períodos consecutivos, poderia permitir uma melhor compreensão da evolução da infecção pelo HTLV-1 no contexto da resposta imune.

Finalmente, nós identificamos seis compostos quinolínicos com atividade inibitória, *in vitro*, da proliferação espontânea de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Os mecanismos envolvidos na inibição da proliferação espontânea pelos compostos quinolínicos não estão estabelecidos. As quinolinas são inibidores potentes da enzima integrase do HIV (Mekouar, Mouscadet et al. 1998). Entretanto, a ação destes compostos na atividade da enzima integrase do HTLV-1 não está descrita. Assim, estudos futuros precisam ser realizados para elucidar os mecanismos de ação destes compostos. Particularmente, o efeito destes compostos na produção de citocinas como IL-2, IFN- γ , IL-10, assim como no perfil de ativação dos linfócitos e na carga proviral necessitam ser avaliados.

7. Conclusões

Nossos resultados sugerem que a ativação do sistema imune possa induzir um grau imunossupressão em indivíduos infectados pelo HTLV-1, refletida pela diminuição dos índices de estimulação aos antígenos de memória, mesmo naqueles indivíduos que não apresentam proliferação espontânea. A implicação destes achados no risco de indivíduos infectados desenvolverem outras doenças infecciosas permanece desconhecido.

Estudos futuros devem ser realizados para uma melhor compreensão deste fenômeno.

Compostos quinolínicos apresentaram atividade inibitória na proliferação espontânea de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

8. Perspectivas:

- Correlacionar a capacidade de resposta aos antígenos de memória à carga proviral;
- Ampliar o número de indivíduos no estudo do perfil de ativação de linfócitos T de indivíduos infectados pelo HTLV-1;
- Correlacionar perfil de ativação e a carga proviral;
- Estudar o papel das células dendríticas na hiporresponsividade dos linfócitos T aos antígenos de memória;
- Avaliar a resposta imune na co-infecção HTLV-1 e tuberculose, com o objetivo de verificar claramente a existência de imunossupressão entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1;
- Investigar possíveis mecanismos pelos quais os compostos quinolínicos foram capazes de inibir a proliferação celular espontânea na infecção pelo HTLV-1.

9. Referências Bibliográficas

- Al-Fahim, A., P. Cabre, et al. (1999). "Blood mononuclear cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy: lymphocytes are highly activated and adhesion to endothelial cells is increased." Cell Immunol **198**(1): 1-10.
- Andrade, T. M., I. Dourado, et al. (1998). "Associations among HTLV-I, HTLV-II, and HIV in injecting drug users in Salvador, Brazil." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **18**(2): 186-7.
- Azran, I., Y. Schavinsky-Khrapunsky, et al. (2004). "Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity." Retrovirology **1**(1): 20.
- Bangham, C. R. (2003). "The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1." J Gen Virol **84**(Pt 12): 3177-89.
- Barmak, K., E. W. Harhaj, et al. (2003). "Mediators of central nervous system damage during the progression of human T-cell leukemia type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis." J Neurovirol **9**(5): 522-9.
- Bazarbachi, A. and O. Hermine (1996). "Treatment with a combination of zidovudine and alpha-interferon in naive and pretreated adult T-cell leukemia/lymphoma patients." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **13 Suppl 1**: S186-90.
- Biddison, W. E., R. Kubota, et al. (1997). "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 **159**(4): 2018-25.
- Biglione, M. M., M. Pizarro, et al. (2003). "A possible case of myelopathy/tropical spastic paraparesis in an Argentinian woman with human T lymphocyte virus type II." Clin Infect Dis **37**(3): 456-8.
- Blas, M., F. Bravo, et al. (2005). "Norwegian scabies in Peru: the impact of human T cell lymphotropic virus type I infection." Am J Trop Med Hyg **72**(6): 855-7.

- Blattner, W. A., C. Saxinger, et al. (1990). "A study of HTLV-I and its associated risk factors in Trinidad and Tobago." J Acquir Immune Defic Syndr **3**(11): 1102-8.
- Blejer, J. L., M. C. Saguier, et al. (1995). "[Determination of anti-HTLV-I/II antibodies: Experience in 28,897 blood donations in Buenos Aires]." Sangre (Barc) **40**(6): 447-51.
- Brites, C., M. Weyll, et al. (2002). "Severe and Norwegian scabies are strongly associated with retroviral (HIV-1/HTLV-1) infection in Bahia, Brazil." Aids **16**(9): 1292-3.
- Brito-Melo, G. E., O. A. Martins-Filho, et al. (2002). "Phenotypic study of peripheral blood leucocytes in HTLV-I-infected individuals from Minas Gerais, Brazil." Scand J Immunol **55**(6): 621-8.
- Buckle, G. J., D. A. Hafler, et al. (1996). "HTLV-I-induced T-cell activation." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **13 Suppl 1**: S107-13.
- Calattini, S., S. A. Chevalier, et al. (2005). "Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa." Retrovirology **2**(1): 30.
- Carneiro-Proietti, A. B., J. G. Ribas, et al. (2002). "[Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil]." Rev Soc Bras Med Trop **35**(5): 499-508.
- Caruso, A., A. Cantalamessa, et al. (1994). "Expression of CD28 on CD8+ and CD4+ lymphocytes during HIV infection." Scand J Immunol **40**(5): 485-90.
- Carvalho, E. M., O. Bacellar, et al. (2001). "Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors." J Acquir Immune Defic Syndr **27**(1): 1-6.
- Cavrois, M., A. Gessain, et al. (1996). "Proliferation of HTLV-1 infected circulating cells in vivo in all asymptomatic carriers and patients with TSP/HAM." Oncogene **12**(11): 2419-23.
- Charman, H. P., N. Kim, et al. (1975). "Natural and experimentally induced antibodies to defined mammalian type-C virus proteins in primates." J Natl Cancer Inst **55**(6): 1419-24.

- Clerici, M., F. T. Hakim, et al. (1993). "Changes in interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals." J Clin Invest **91**(3): 759-65.
- Clerici, M., N. I. Stocks, et al. (1989). "Detection of three distinct patterns of T helper cell dysfunction in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive patients. Independence of CD4+ cell numbers and clinical staging." J Clin Invest **84**(6): 1892-9.
- Copeland, K. F., A. G. Haaksma, et al. (1994). "Inhibition of apoptosis in T cells expressing human T cell leukemia virus type I Tax." AIDS Res Hum Retroviruses **10**(10): 1259-68.
- Dezzutti, C. S., D. L. Rudolph, et al. (1995). "Infection with human T-lymphotropic virus types I and II results in alterations of cellular receptors, including the up-modulation of T-cell counterreceptors CD40, CD54, and CD80 (B7-1)." Clin Diagn Lab Immunol **2**(3): 349-55.
- dos Santos, J. I., M. A. Lopes, et al. (1995). "Seroprevalence of HIV, HTLV-I/II and other perinatally-transmitted pathogens in Salvador, Bahia." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **37**(4): 343-8.
- Dourado, I., L. C. Alcantara, et al. (2003). "HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics." J Acquir Immune Defic Syndr **34**(5): 527-31.
- Dourado, I., T. Andrade, et al. (1998). "HTLV-I in Northeast Brazil: differences for male and female injecting drug users." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **19**(4): 426-9.
- Dutra, W. O., O. A. Martins-Filho, et al. (1996). "Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes." Scand J Immunol **43**(1): 88-93.
- Edlich, R. F., J. A. Arnette, et al. (2000). "Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I)." J Emerg Med **18**(1): 109-19.
- Eiraku, N., R. Hingorani, et al. (1998). "Clonal expansion within CD4+ and CD8+ T cell subsets in human T lymphotropic virus type I-infected individuals." J Immunol **161**(12): 6674-80.

- Elovaara, I., S. Koenig, et al. (1993). "High human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific precursor cytotoxic T lymphocyte frequencies in patients with HTLV-1-associated neurological disease." J Exp Med **177**(6): 1567-73.
- Fakhfakh, M. A., A. Fournet, et al. (2003). "Synthesis and biological evaluation of substituted quinolines: potential treatment of protozoal and retroviral co-infections." Bioorg Med Chem **11**(23): 5013-23.
- Ferrer, J. F., D. M. Bhatt, et al. (1975). "Further studies on the antigenic properties and distribution of the putative bovine leukemia virus." Bibl Haematol(40): 59-66.
- Fournet, A., A. A. Barrios, et al. (1993). "2-substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs." Antimicrob Agents Chemother **37**(4): 859-63.
- Fournet, A., M. E. Ferreira, et al. (1996). "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 **40**(11): 2447-51.
- Fournet, A., R. Mahieux, et al. (2003). "Substituted quinolines induce inhibition of proliferation of HTLV-1 infected cells." Bioorg Med Chem Lett **13**(5): 891-4.
- Furnia, A., R. Lal, et al. (1999). "Estimating the time of HTLV-I infection following mother-to-child transmission in a breast-feeding population in Jamaica." J Med Virol **59**(4): 541-6.
- Furukawa, Y., M. Saito, et al. (2003). "Different cytokine production in tax-expressing cells between patients with human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic HTLV-I carriers." J Infect Dis **187**(7): 1116-25.
- Gallo, D., L. M. Penning, et al. (1991). "Detection and differentiation of antibodies to human T-cell lymphotropic virus types I and II by the immunofluorescence method." J Clin Microbiol **29**(10): 2345-7.
- Gantier, J. C., A. Fournet, et al. (1996). "The effect of some 2-substituted quinolines isolated from *Galipea longiflora* on *Plasmodium vinckei petteri* infected mice." Planta Med **62**(3): 285-6.

- Gessain, A., F. Barin, et al. (1985). "Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis." Lancet **2**(8452): 407-10.
- Gessain, A., F. Saal, et al. (1990). "High human T-cell lymphotropic virus type I proviral DNA load with polyclonal integration in peripheral blood mononuclear cells of French West Indian, Guianese, and African patients with tropical spastic paraparesis." Blood **75**(2): 428-33.
- Goon, P. K., E. Hanon, et al. (2002). "High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis." Blood **99**(9): 3335-41.
- Goon, P. K., T. Igakura, et al. (2003). "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 **77**(17): 9716-22.
- Grassi, F., A. Hosmalin, et al. (1999). "Depletion in blood CD11c-positive dendritic cells from HIV-infected patients." Aids **13**(7): 759-66.
- Hanon, E., S. Hall, et al. (2000). "Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes." Blood **95**(4): 1386-92.
- Hanon E., Asquith, et al., (2000). "High frequency of viral protein expression in human T cell lymphotropic virus type 1-infected peripheral blood mononuclear cells." AIDS Res Hum Retroviruses. **16**(16): 1711-5.
- Hinuma, Y., K. Nagata, et al. (1981). "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 **78**(10): 6476-80.
- Hollsberg, P. (1999). "Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I." Microbiol Mol Biol Rev **63**(2): 308-33.
- Hollsberg, P. and D. A. Hafler (1993). "Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type I infection." N Engl J Med **328**(16): 1173-82.
- Holm, Nielsen et al. (2004) "CD4+CD25+ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology." APMIS **112**(10): 629-41.

- Ijichi, S., T. Matsuda, et al. (1990). "Arthritis in a human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) carrier." Ann Rheum Dis **49**(9): 718-21.
- Itoyama, Y., J. Kira, et al. (1989). "Increases in helper inducer T cells and activated T cells in HTLV-I-associated myelopathy." Ann Neurol **26**(2): 257-62.
- Itoyama, Y., S. Minato, et al. (1988). "Spontaneous proliferation of peripheral blood lymphocytes increased in patients with HTLV-I-associated myelopathy." Neurology **38**(8): 1302-7.
- Iwashiro, M., R. J. Messer, et al. (2001). "Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(16): 9226-30.
- Jacobson, S., T. Lehky, et al. (1993). "Isolation of HTLV-II from a patient with chronic, progressive neurological disease clinically indistinguishable from HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis." Ann Neurol **33**(4): 392-6.
- Jacobson, S., C. S. Raine, et al. (1988). "Isolation of an HTLV-1-like retrovirus from patients with tropical spastic paraparesis." Nature **331**(6156): 540-3.
- Jacobson, S., Z. Zaninovic, et al. (1988). "Immunological findings in neurological diseases associated with antibodies to HTLV-1: activated lymphocytes in tropical spastic paraparesis." Ann Neurol **23**(14): 196-200.
- Jacobson, S., H. Shida, et al. (1990). "Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease." Nature **348**(6298): 245-8.
- Jarrett, O. (1970). "Evidence for the viral etiology of leukemia in the domestic mammals." Adv Cancer Res **13**: 39-62.
- Jeffery, K. J., A. A. Siddiqui, et al. (2000). "The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection." J Immunol **165**(12): 7278-84.
- Jeffery, K. J., K. Usuku, et al. (1999). "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 **96**(7): 3848-53.

- Kajiyama, W., S. Kashiwagi, et al. (1986). "Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus." J Infect Dis **154**(5): 851-7.
- Kalyanaraman, V. S., M. G. Sarngadharan, et al. (1982). "A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia." Science **218**(4572): 571-3.
- Kannagi, M., S. Harada, et al. (1991). "Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8+ cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells." Int Immunol **3**(8): 761-7.
- Kaplan, J. E., B. Litchfield, et al. (1991). "HTLV-I-associated myelopathy associated with blood transfusion in the United States: epidemiologic and molecular evidence linking donor and recipient." Neurology **41**(2 (Pt 1)): 192-7.
- Kashala, O., R. Marlink, et al. (1994). "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 **169**(2): 296-304.
- Kitagawa, T., M. Fujishita, et al. (1986). "Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil." Jama **256**(17): 2342.
- Kohtz, D. S., A. Altman, et al. (1988). "Immunological and structural homology between human T-cell leukemia virus type I envelope glycoprotein and a region of human interleukin-2 implicated in binding the beta receptor." J Virol **62**(2): 659-62.
- Kramer, A., S. Jacobson, et al. (1989). "Spontaneous lymphocyte proliferation in symptom-free HTLV-I positive Jamaicans." Lancet **2**(8668): 923-4.
- Kubota, R., T. Kawanishi, et al. (1998). "Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-specific CD8+ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection." J Immunol **161**(1): 482-8.
- LaGrenade, L., B. Hanchard, et al. (1990). "Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection." Lancet **336**(8727): 1345-7.

- Lane, H. C., H. Masur, et al. (1985). "Correlation between immunologic function and clinical subpopulations of patients with the acquired immune deficiency syndrome." Am J Med **78**(3): 417-22.
- Lunardi-Iskandar, Y., A. Gessain, et al. (1993). "Abnormal in vitro proliferation and differentiation of T cell colony-forming cells in patients with tropical spastic paraparesis/human T lymphocyte virus type I (HTLV-I)-associated myeloencephalopathy and healthy HTLV-I carriers." J Exp Med **177**(3): 741-50.
- Macatonia, S. E., J. K. Cruickshank, et al. (1992). "Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation." AIDS Res Hum Retroviruses **8**(9): 1699-706.
- Maloney, E. M., E. L. Murphy, et al. (1991). "Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. II. Geographic and ecologic determinants." Am J Epidemiol **133**(11): 1125-34.
- Manel, N., F. J. Kim, et al. (2003). "The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV." Cell **115**(4): 449-59.
- Manns, A., E. L. Murphy, et al. (1991). "Detection of early human T-cell lymphotropic virus type I antibody patterns during seroconversion among transfusion recipients." Blood **77**(4): 896-905.
- Manns, A., R. J. Wilks, et al. (1992). "A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion." Int J Cancer **51**(6): 886-91.
- Marinho, J., B. Galvao-Castro, et al. (2005). "Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case-control study." J Acquir Immune Defic Syndr **40**(5): 625-8.
- Marsh, B. J. (1996). "Infectious complications of human T cell leukemia/lymphoma virus type I infection." Clin Infect Dis **23**(1): 138-45.
- Martins-Filho, O. A., J. R. Cunha-Melo, et al. (1999). "Clinical forms of human *Schistosoma mansoni* infection are associated with differential activation of T-cell subsets and costimulatory molecules." Dig Dis Sci **44**(3): 570-7.

- Matsumoto, M., M. Sugimoto, et al. (1990). "Spontaneous T cell proliferation and release of soluble interleukin-2 receptors in patients with HTLV-I-associated myelopathy." Am J Trop Med Hyg **42**(4): 365-73.
- Matsuzaki, T., H. Ootose, et al. (1993). "Diseases among men living in human T-lymphotropic virus type I endemic areas in Japan." Intern Med **32**(8): 623-8.
- Matutes, E., G. P. Taylor, et al. (2001). "Interferon alpha and zidovudine therapy in adult T-cell leukaemia lymphoma: response and outcome in 15 patients." Br J Haematol **113**(3): 779-84.
- Mekouar, K., J. F. Mouscadet, et al. (1998). "Styrylquinoline derivatives: a new class of potent HIV-1 integrase inhibitors that block HIV-1 replication in CEM cells." J Med Chem **41**(15): 2846-57.
- Mochizuki, M., K. Yamaguchi, et al. (1992). "HTLV-I and uveitis." Lancet **339**(8801): 1110.
- Moreira, E. D., Jr., T. T. Ribeiro, et al. (1993). "Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in northeastern Brazil." J Acquir Immune Defic Syndr **6**(8): 959-63.
- Morgan, O. S., P. Rodgers-Johnson, et al. (1989). "HTLV-1 and polymyositis in Jamaica." Lancet **2**(8673): 1184-7.
- Moritoyo, T., S. Izumo, et al. (1999). "Detection of human T-lymphotropic virus type I p40tax protein in cerebrospinal fluid cells from patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis." J Neurovirol **5**(3): 241-8.
- Mueller, N. (1991). "The epidemiology of HTLV-I infection." Cancer Causes Control **2**(1): 37-52.
- Mueller, N., A. Okayama, et al. (1996). "Findings from the Miyazaki Cohort Study." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **13** Suppl 1: S2-7.
- Muneishi, Taguchi, et al. (1998). "Prevalence of HTLV-1 in leprosy patients in two sanatoriums in Japan." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **17**(4): 380-3.

- Murai, K., N. Tachibana, et al. (1990). "Suppression of delayed-type hypersensitivity to PPD and PHA in elderly HTLV-I carriers." J Acquir Immune Defic Syndr **3**(10): 1006-9.
- Murray, Rubin et al. (1984). "Impaired production of lymphokines and immune (gamma) interferon in the acquired immunodeficiency syndrome." N Engl J Med **310**(14): 833-9.
- Nagai, M., K. Usuku, et al. (1998). "Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP." J Neurovirol **4**(6): 586-93.
- Nakada, K., M. Kohakura, et al. (1984). "High incidence of HTLV antibody in carriers of *Strongyloides stercoralis*." Lancet **1**(8377): 633.
- Nakamura, Furuya et al. (2000). "Importance of immune deviation toward Th1 in the early immunopathogenesis of human T lymphotropic virus type I associated myelopathy." Med Hypotheses **54**(5): 777-82.
- Nakayama, H., M. E. Ferreira, et al. (2001). "Experimental treatment of chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice with 2-n-propylquinoline." Phytother Res **15**(7): 630-2.
- Newbound, G. C., J. M. Andrews, et al. (1996). "Human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax mediates enhanced transcription in CD4+ T lymphocytes." J Virol **70**(4): 2101-6.
- Newton, R. C., P. Limpuangthip, et al. (1992). "*Strongyloides stercoralis* hyperinfection in a carrier of HTLV-I virus with evidence of selective immunosuppression." Am J Med **92**(2): 202-8.
- Nielsen, Holm, et al. (2004). "Cd4+CD25+ regulatory T cell: II. Origen, disease models and clinical aspects." APMIS **112**(10): 642-50.
- Nishiura, Y., T. Nakamura, et al. (1996). "Increased production of inflammatory cytokines in cultured CD4+ cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy." Tohoku J Exp Med **179**(4): 227-33.
- Okochi, K. and H. Sato (1984). "Transmission of ATL (HTLV-I) through blood transfusion." Princess Takamatsu Symp **15**: 129-35.

- Olindo, S., A. Lezin, et al. (2005). "HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression." J Neurol Sci **237**(1-2): 53-9.
- Osame, M. (1990). Review of WHO Kagoshima Meeting and Diagnostic Guidelines for HAM/TSP. Human Retrovirology: HTLV. A. B. William. New York, Raven Press, Ltd: 191-197.
- Osame, M., S. Izumo, et al. (1986). "Blood transfusion and HTLV-I associated myelopathy." Lancet **2**(8498): 104-5.
- Osame, M., K. Usuku, et al. (1986). "HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity." Lancet **1**(8488): 1031-2.
- Parker, C. E., S. Daenke, et al. (1992). "Activated, HTLV-1-specific cytotoxic T-lymphocytes are found in healthy seropositives as well as in patients with tropical spastic paraparesis." Virology **188**(2): 628-36.
- Pedral-Sampaio, D. B., E. Martins Netto, et al. (1997). "Co-Infection of Tuberculosis and HIV/HTLV Retroviruses: Frequency and Prognosis Among Patients Admitted in a Brazilian Hospital." Braz J Infect Dis **1**(1): 31-35.
- Peters, A. A., J. J. Oger, et al. (1999). "An apparent case of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II)-associated neurological disease: a clinical, molecular, and phylogenetic characterisation." J Clin Virol **14**(1): 37-50.
- Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, et al. (1980). "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(12): 7415-9.
- Popovic, M., N. Flomenberg, et al. (1984). "Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-I or HTLV-II." Science **226**(4673): 459-62.
- Popovic, M., G. Lange-Wantzin, et al. (1983). "Transformation of human umbilical cord blood T cells by human T-cell leukemia/lymphoma virus." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(17): 5402-6.
- Porto, A. F., F. A. Neva, et al. (2001). "HTLV-1 decreases Th2 type of immune response in patients with strongyloidiasis." Parasite Immunol **23**(9): 503-7.

- Porto, A. F., S. B. Santos, et al. (2005). "Helminthic infection down-regulates type 1 immune responses in human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) carriers and is more prevalent in HTLV-1 carriers than in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis." J Infect Dis **191**(4): 612-8.
- Porto, M. A., A. Muniz, et al. (2002). "[Clinical and immunological consequences of the association between HTLV-1 and strongyloidiasis]." Rev Soc Bras Med Trop **35**(6): 641-9.
- Prince, H. E., H. Lee, et al. (1991). "Immunologic correlates of spontaneous lymphocyte proliferation in human T-lymphotropic virus infection." Blood **78**(1): 169-74.
- Prince, H. E., J. York, et al. (1995). "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 **102**(2): 256-61.
- Richardson, J. H., A. J. Edwards, et al. (1990). "In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1." J Virol **64**(11): 5682-7.
- Robinson, R. D., J. F. Lindo, et al. (1994). "Immunoepidemiologic studies of Strongyloides stercoralis and human T lymphotropic virus type I infections in Jamaica." J Infect Dis **169**(3): 692-6.
- Romero, I. A., M. C. Prevost, et al. (2000). "Interactions between brain endothelial cells and human T-cell leukemia virus type 1-infected lymphocytes: mechanisms of viral entry into the central nervous system." J Virol **74**(13): 6021-30.
- Saito, M., M. Nakagawa, et al. (2004). "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 **189**(1): 29-40.
- Saito, S., Y. Ando, et al. (1990). "[Detection of HTLV-I genome in infants born to HTLV-I seropositive mothers by polymerase chain reaction]." Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi **42**(3): 234-40.

- Saji, F., Y. Tokugawa, et al. (1989). "Vertical transmission of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I): detection of proviral DNA in HTLV-I carrier grávida." J Clin Immunol **9**(5): 409-14.
- Sakai, J. A., M. Nagai, et al. (2001). "In vitro spontaneous lymphoproliferation in patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease: predominant expansion of CD8+ T cells." Blood **98**(5): 1506-11.
- Santos, S. B., A. F. Porto, et al. (2004). "Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers." BMC Infect Dis **4**(1): 7.
- Sato, Y. and Y. Shiroma (1989). "Concurrent infections with Strongyloides and T-cell leukemia virus and their possible effect on immune responses of host." Clin Immunol Immunopathol **52**(2): 214-24.
- Sato, Y., Y. Shiroma, et al. (1994). "Reduced efficacy of chemotherapy might accumulate concurrent HTLV-1 infection among strongyloidiasis patients in Okinawa, Japan." Trans R Soc Trop Med Hyg **88**(1): 59.
- Seiki, M., R. Eddy, et al. (1984). "Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells." Nature **309**(5969): 640-2.
- Sodroski, J. (1992). "The human T-cell leukemia virus (HTLV) transactivator (Tax) protein." Biochim Biophys Acta **1114**(1): 19-29.
- Sonoda, S., T. Fujiyoshi, et al. (1996). "Immunogenetics of HTLV-I/II and associated diseases." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **13** **Suppl 1**: S119-23.
- Stuver, S. O. and N. E. Mueller (1995). "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 **142**(11): 1247-8.
- Stuver, S. O., N. Tachibana, et al. (1993). "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 **167**(1): 57-65.

- Sugimoto, M. (1993). "[Interstitial pneumonia in patients with human T-cell lymphotropic virus type-1 infection]." Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi **31 Suppl**: 36-41.
- Sugimoto, Mita (1993). "Pulmonary involvement in human T cell lymphotropic virus type I uveitis: T-lymphocytosis and high proviral DNA load in bronchoalveolar lavage fluid." Eur Respir J **6(7)**: 938-43.
- Sullivan, M. T., A. E. Williams, et al. (1991). "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 **151(10)**: 2043-8.
- Suzuki, M., C. S. Dezzutti, et al. (1999). "Modulation of T-cell responses to a recall antigen in human T-cell leukemia virus type 1-infected individuals." Clin Diagn Lab Immunol **6(5)**: 713-7.
- Suzuki, T., H. Hirai, et al. (1995). "Tax protein of HTLV-1 destabilizes the complexes of NF-kappa B and I kappa B-alpha and induces nuclear translocation of NF-kappa B for transcriptional activation." Oncogene **10(6)**: 1199-207.
- Suzuki, T., M. Uchida-Toita, et al. (1999). "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 **18(28)**: 4137-43.
- Tachibana, N., A. Okayama, et al. (1988). "Suppression of tuberculin skin reaction in healthy HTLV-I carriers from Japan." Int J Cancer **42(6)**: 829-31.
- Takeshita, T. and H. Takeshita (2000). "Crusted (Norwegian) scabies in a patient with smoldering adult T-cell leukemia." J Dermatol **27(10)**: 677-9.
- Takezaki, T., K. Tajima, et al. (1997). "Short-term breast-feeding may reduce the risk of vertical transmission of HTLV-I. The Tsushima ATL Study Group." Leukemia **11 Suppl 3**: 60-2.
- Tashiro, Yamasaki et al. (1992). "Immunological studies on opportunistic infections and development of adult T cell leukemia." Intern Med **31(9)**: 1132-6.

- Tekle-Haimanot, R., D. Frommel, et al. (1991). "A survey of HTLV-1 and HIVs in Ethiopian leprosy patients." Aids **5**(1): 108-10.
- Uchiyama, T., J. Yodoi, et al. (1977). "Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases." Blood **50**(3): 481-92.
- Verdier, M., F. Denis, et al. (1990). "Antibodies to human T lymphotropic virus type 1 in patients with leprosy in tropical areas." J Infect Dis **161**(6): 1309-10.
- Vernant, J. C., L. Maurs, et al. (1987). "Endemic tropical spastic paraparesis associated with human T-lymphotropic virus type I: a clinical and seroepidemiological study of 25 cases." Ann Neurol **21**(2): 123-30.
- Watanabe, H., T. Nakamura, et al. (1995). "Exaggerated messenger RNA expression of inflammatory cytokines in human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy." Arch Neurol **52**(3): 276-80.
- Watanabe, T., M. Seiki, et al. (1984). "HTLV type I (U. S. isolate) and ATL (Japanese isolate) are the same species of human retrovirus." Virology **133**(1): 238-41.
- Welles, S. L., N. Tachibana, et al. (1994). "Decreased reactivity to PPD among HTLV-I carriers in relation to virus and hematologic status." Int J Cancer **56**(3): 337-40.
- Wiktor, S. Z., E. J. Pate, et al. (1997). "Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I associated with prolonged breast-feeding." J Hum Virol **1**(1): 37-44.
- Wolfe, N. D., W. Henelne, et al. (2005). "Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(22): 7994-9.
- Yakova, M., A. Lezin, et al. (2005). "Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease." Retrovirology **2**(1): 4.
- Yamano, Y., N. Takenouchi, et al. (2005). "Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease." J Clin Invest **115**(5): 1361-8.

- Yamasaki, K., J. Kira, et al. (1997). "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 **147**(2): 135-44.
- Yoshida, M., J. Inoue, et al. (1989). "Molecular mechanisms of regulation of HTLV-1 gene expression and its association with leukemogenesis." Genome **31**(2): 662-7.
- Zouhiri, F., J. F. Mouscadet, et al. (2000). "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 **43**(8): 1533-40.

10. Anexo

Manuscrito publicado durante o curso do doutorado

Research Letter

AIDS 2006, 20:000–000

Tracing the origin of Brazilian HTLV-1 as determined by analysis of host and viral genes

Luiz C.J. Alcantara^{a,b}, Tulio de Oliveira^c, Michelle Gordon^c, Oliver Pybus^d, Rita Elizabeth Mascarenhas^{a,b}, Magda O. Seixas^c, Marilda Gonçalves^c, Carol Hlela^f, Sharon Cassol^f and Bernardo Galvão-Castro^{a,b}

We compared the genetic diversity of the Brazilian human T-cell lymphotropic virus type 1 isolates with those found in KwaZulu–Natal (KZN), South Africa, and with the genetic background of the hosts. The seroprevalence rate in KZN was 1.7%. All sequences belonged to the A subgroup. The presence of South African sequences in two different clusters from Brazil, and the finding of the β^A -globin haplotype in infected hosts are consistent with the transmission of this virus from southern Africa to Brazil.

The origins of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) in Salvador, a Brazilian city in the Bahia State, are not fully understood and are difficult to trace. One hypothesis suggests that the virus was introduced into south America from Africa, during the post-Columbian slave trade [1]. The majority of Africans who came to Salvador during this period of time were from west Africa, where only the HTLV-1 C subgroup of the Cosmopolitan (a) subtype has been found. Previous studies reported that HTLV-1 strains from Salvador belong to the A subgroup [2], as it was also previously demonstrated in KwaZulu–Natal (KZN), South Africa [3]. We attempted to resolve this discrepancy by studying the β^A -globin haplotype of HTLV-1-infected individuals living in Salvador [2]. The detection of HTLV-1a subgroup A among the Bantu people from Salvador could suggest that Brazil strains may have originated from southern Africa. To examine this possibility, we conducted detailed sequence and evolutionary analyses, comparing the genetic diversity and molecular phylogenies between Brazil and KZN HTLV-1 isolates, and with the genetic background of the infected hosts.

A total of 1435 samples were collected from HIV-1-uninfected and infected treatment-naïve individuals obtained in Durban, KZN, South Africa, and surrounding areas, after approval from the University of KZN Ethical Board. Plasma was screened for HTLV-1/2 antibodies by enzyme immunoassay. DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (enzyme immunoassay-positive samples) using QIAamp (Qiagen,

USA). *Pol* gene-nested polymerase chain reaction was performed to differentiate between HTLV-1 and 2 [4]. Long-term repeat (LTR) fragments were amplified from 19 DNA samples as previously reported [2], and included another 10 samples from Salvador, collected as part of a previous study [2]. The products were purified and sequenced directly on a 3100 genetic analyser (Applied Biosystems, California, USA). Phylogenetic trees of 724 basepair LTR sequences were generated using the neighbour-joining and maximum-likelihood (ML) methods of PAUP* software, version 4.0b10 [5]. Two sets of LTR sequence alignments from mother–infant pairs in KZN were available for an estimation of the HTLV-1 evolutionary rate (nucleotide/site/year). The evolutionary rate of each set was calculated using a homogeneous Poisson model, as previously described [6]. Genotyping of human β^A -globin was performed on 10 HTLV-1-infected individuals (five South Africa and five Brazil) as previously described [4]. The haplotype patterns for South African and Brazil isolates were compared with those typical haplotypes from the Central African Republic (CAR; Bantu), Benin, Senegal and Cameroon.

The HTLV-1 seroprevalence in KZN was 1.7% (24). The average intersequence diversity among Brazil LTR sequences was significantly higher than among KZN sequences ($1.42 \times 0.7\%$), even when epidemiologically linked samples were excluded from the KZN analysis (0.78%). As expected, sequences from transmission pairs were highly conserved (divergence of 0.1%) with only one polymorphism being detected in the LTR region of one family. Phylogenetic analysis showed that all South Africa and Brazil sequences belonged to subgroup A of the HTLV-1a (Fig. 1). Two distinct clusters of Latin American sequences (A and B) were identified within the A subgroup, both supported by high bootstrap and by ML. At the main cluster (A), two new isolates from KZN (HTLV04 and HTLV06) formed a monophyletic outgroup, a finding also supported by both bootstrap and ML. The second cluster (B) contained a new KZN isolate (HTLV24). Analysing all 20 β^A -globin chromosomes, we identified two Senegal, six Benin and 12 CAR haplotypes. Among South Africa, four were homozygous for either the Benin/Benin ($n = 2$) or CAR/CAR ($n = 2$) haplotypes; and one was Benin/CAR heterozygote. Two Brazil were homozygous (CAR/CAR) and three (60%) were heterozygous: two for the Senegal/CAR, and one for the Benin/CAR haplotype. Based on a single mutation in the LTR region of one mother–child pair, the minimum and maximum age of transmission was calculated to be 20 and 102 years. The average HTLV-1

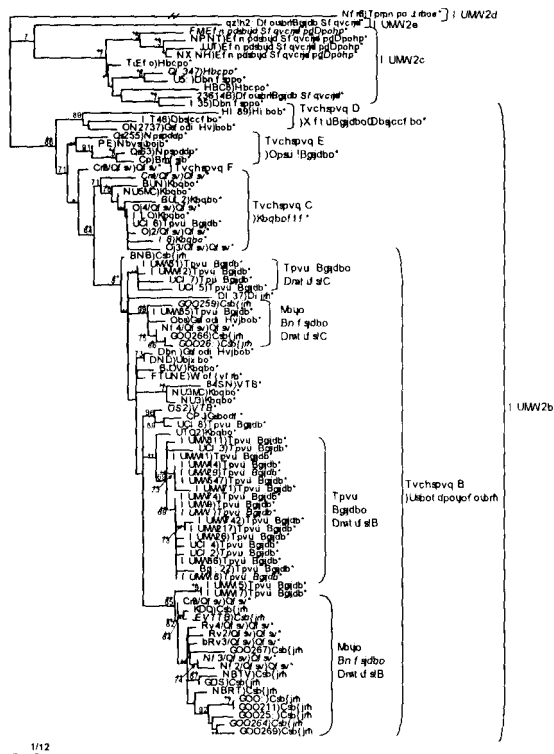


Fig. 1. Rooted neighbour-joining tree of human T-cell lymphotropic virus type 1 strains based upon a 724 bp of the total long-term repeat region. The Tamura-Nei evolutionary model with Γ -distribution was selected and the tree was drawn using TreeView, version 1.4. The bootstrap values (above 50% and using 1000 bootstraps) on the branches represent the percentage of trees for which the sequences at the right end of the branch form a monophyletic group. Mel5 is used as the outgroup. Geographical origin and ethnic origin are given between parentheses. Newly sequenced long-term repeats included in this analysis (in bold) are the following Salvador and South African isolates. The ** means that the maximum-likelihood method was highly significant with a P value of less than 0.001 or significant with a P value of less than 0.005. The GenBank accession numbers of the new strains are DQ005546–DQ005574.

evolutionary rate (756 sites) from both transmission pairs was estimated to be 2.16×10^{-5} , with the upper and lower 95% intervals estimated to be 1.30×10^{-4} and 1.13×10^{-6} , respectively. To increase the statistical power of our analysis, we increased our sample size, including published evolutionary data from an additional 16 transmission chains [6]. The combined datasets contained three LTR mutations, and resulted in an average evolutionary rate of 4.49×10^{-6} , with lower and higher intervals in the range of 1.08×10^{-6} and 1.34×10^{-5} . The total transmission time (t) for the

collective dataset (18 transmission pairs) was calculated to be between 539 and 1203 years.

The high degree of relatedness is consistent with the transmission of HTLV-1a subgroup A from South Africa to Brazil, presumably during the slave trade process. Moreover, three LTR sequences from South Africa actually segregated within the Brazil clusters, suggesting that there were probably multiple introductions of HTLV-1 from South Africa to Brazil. Transmission between South Africa and Brazil is also consistent with the similar prevalence rates in KZN (1.7%) and Salvador (1.76%), a city where more than 80% of the population is of African origin [2,7]. The finding that all HTLV-1-infected individuals in our study had the same β^A -globin haplotype is also consistent with the transmission from southern Africa. The source of the CAR haplotype in South Africa is not known, but may reflect the migration of the Bantu population from north to South Africa during the last 3000 years, an event that gave origin to the Zulu tribes of South Africa. Alternatively, the Benin haplotype may have been introduced recently (during the past 300 years) [8]. Finally, the low level of diversity observed among South African isolates was supported by evolutionary analysis of two mother-to-child transmission chains, when the attempts to improve the accuracy of this value, by including data from 16 previously published transmission chains [6], resulted in an estimated evolutionary rate of 4.49×10^{-6} . Unlike the HIV-1, HTLV-1 shows little evidence of adaptation or natural selection, exhibiting a low evolutionary rate. As a result, spatial and demographic processes, such as multiple introductions of the virus during the slave trade, are likely to be among the main processes shaping the structure of phylogenetic trees. Understanding the differences between HTLV-1 and HIV-1 may lead to new insights for controlling the spread and genetic evolution of these important human pathogens.

Acknowledgements

The authors are grateful to Taryn Page and Natalie Graham for the technical assistance and Estrelita van Rensburg for providing the samples.

^aPublic Health Advanced Laboratory, Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil; ^bBahia School of Medicine and Public Health/Foundation for Scientific Development, Salvador, Bahia, Brazil; ^cMolecular Virology and Bioinformatics Unit at Africa Centre for Health and Population Studies, Nelson Mandela Medical School, University of KwaZulu–Natal, Durban, South Africa; ^dDepartment of Zoology, University of Oxford, Oxford, UK; ^eMolecular Biology and Pathology Laboratory, Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil; and ^fHIV-1

Immunopathogenesis Unit, Department of Virology, University of Pretoria, Pretoria, South Africa.

Sponsorship: This work was partly supported by grants from the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) and from the Wellcome Trust (UK) grant 061238/2/00/2 (S.C.).

Received: 1 June 2005; revised: 21 July 2005; accepted: 10 August 2005.

References

1. Vandamme AM, Salemi M, Van Dooren S, Goubau P, Van Brussel M, Desmyter J. **The simian origins of the pathogenic human T-cell lymphotropic virus type I.** *Trends Microbiol* 1998; **6**:477–483.
2. Alcantara LCJ, Van Dooren S, Gonçalves MS, Kashima S, Costa MCR, Santos F, et al. **Globin haplotypes of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) infected individuals in Salvador, Bahia, Brazil suggest a postcolumbian African origin of this virus.** *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; **3**:536–542.
3. Bhigjee AI, Tarin MI, Bill PLA, De Oliveira T, York D. **Sequence of the env gene of some KwaZulu-Natal, South African strains of HTLV type I.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; **15**:1229–1233.
4. Vallejo A, Garcia-Saiz A. **Typing human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I and HTLV-II) by nested polymerase chain reaction: application to clinical specimens.** *J Virol Methods* 1995; **51**:9–17.
5. Gessain A, Boeri E, Yanagihara R, Gallo RC, Francini G. **Complete nucleotide sequence of a highly divergent human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type I (HTLV-I) variant from Melanesia: genetic and phylogenetic relationship to HTLV-I strains from other geographical regions.** *J Virol* 1993; **67**:1015–1023.
6. Van Dooren S, Pybus OG, Salemi M, Liu HF, Goubau P, Remondégui C, et al. **The low evolutionary rate of human T-cell lymphotropic virus type-1 confirmed by analysis of vertical transmission chains.** *Mol Biol Evol* 2004; **21**:603–611.
7. Curtin PD. *The slave Atlantic trade: a census.* Milwaukee: The University of Wisconsin Press; 1969.
8. Shillington K. *History of Africa.* London: Macmillan Education Ltd; 1995.

QAD	
Manuscript No.	200139

AIDS
Typeset by Thomson Digital for
Lippincott Williams & Wilkins

Dear Author,

During the preparation of your manuscript for typesetting, some queries have arisen. These are listed below. Please check your typeset proof carefully and mark any corrections in the margin as neatly as possible or compile them as a separate list. This form should then be returned with your marked proof/list of corrections to the Production Editor.

QUERIES: to be answered by AUTHOR/EDITOR		
AUTHOR: The following queries have arisen during the editing of your manuscript. Please answer the queries by marking the requisite corrections at the appropriate positions in the text.		
	No query.	

Artigo aceito para publicação

Peripheral Blood Mononuclear Cells from Individuals Infected with Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Have a Reduced Capacity To Respond to Recall Antigens

Rita Elizabeth Mascarenhas,^{1,4} Cláudia Brodskyn,² Geisa Barbosa,^{1,4} Jorge Clarêncio,²
Antônio Souza Andrade-Filho,^{3,4} Frederico Figueiroa,^{3,4} Bernardo Galvão-Castro,^{1,4}
and Fernanda Grassi^{1,4*}

Advanced Laboratory of Public Health/Gonçalo Moniz Research Center (CPqGM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil¹; Microbiology and Immunoregulation of Integrate Laboratory/Gonçalo Moniz Research Center (CPqGM), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil²; Neurology and Neurosurgery Foundation, Salvador, Bahia, Brazil³; and Bahiana School of Medicine and Public Health, Salvador, Bahia, Brazil⁴

Received 12 July 2005/Returned for modification 11 August 2005/Accepted 16 March 2006

Evidence indicates that human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection leads to chronic immunosuppression and a greater susceptibility to infectious diseases. Spontaneous in vitro proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) is an important immunological feature of HTLV-1-infected individuals. However, the association between spontaneous proliferation and immunosuppression is not clear. In this study, we evaluated the cellular immune responses of PBMC from 58 asymptomatic HTLV-1-infected individuals with PBMC showing or not showing spontaneous proliferation. Individuals with PBMC that spontaneously proliferated had increased proportions of CD4 T cells expressing CD45RO and dramatically reduced responses to recall antigens. In addition, frequencies of positive responses to recall antigens were also decreased in HTLV-1-infected individuals without spontaneous proliferation of PBMC. There was a polyclonal expansion of multiple T-cell receptor V β families of CD4⁺ T lymphocytes in patients with spontaneous proliferation. We observed that HTLV-1 induced an immunosuppression characterized by a decrease in the stimulation index to a recall antigen, even in individuals who did not present spontaneous proliferation. On the other hand, only patients with PBMC presenting spontaneous proliferation showed polyclonal activation and increased proportion of CD4 T cells expressing CD45RO.

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a human retrovirus that has infected 10 to 20 million people worldwide (3). There are areas in Japan, the Caribbean, Melanesia, central and western Africa, and South America that are large endemic foci (17, 35). In Brazil, the overall prevalence of HTLV-1 infection in blood donors is 0.45%, and the city of Salvador (located in the northeast) has the highest prevalence (1.35%) in the country (4). Recently, a population-based cross-sectional study performed in Salvador, Brazil, found an HTLV-1 seroprevalence of 1.76% (2).

Two diseases are clearly associated with HTLV-1 infection: adult T-cell leukemia/lymphoma (6, 26, 34) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (5, 24). Although 95% of infected people remain asymptomatic (7), there is evidence that HTLV-1 has a much broader spectrum of disease manifestations, such as uveitis (20), arthritis (8, 12), polymyositis (22), lymphocytic interstitial pneumonia (31), and infective dermatitis in children (15). Severe immunosuppression is well documented in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma (10, 19). However, a growing body of literature suggests that many HTLV-1-infected individuals show chronic immunosuppression, even in the absence of malignant disease. HTLV-1-infected individuals are more susceptible to several

infectious diseases, such as strongyloidiasis (1, 30), Hansen's disease (11), and tuberculosis (21, 25). In addition, they have reduced cutaneous delayed-type hypersensitivity responses to purified protein derivative (PPD) of *Mycobacterium tuberculosis* (14, 23, 33, 36).

The immunologic hallmark of HTLV-1-infected individuals is a spontaneous in vitro proliferation of their peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (without any added antigen) observed in approximately fifty percent of patients (13, 27, 29). The memory CD4⁺ CD45RO⁺ subset is the principal T-cell population involved in this phenomenon (29). In this study, we evaluated the cellular immune responses of HTLV-1-infected individuals (with or without PBMC spontaneous proliferation) against candidin, cytomegalovirus (CMV), PPD, and tetanus toxoid (TT) recall antigens.

We observed that HTLV-1-infected individuals had reduced stimulation indexes to recall antigens, even when their PBMC did not spontaneously proliferate. On the other hand, only the individuals with spontaneous PBMC proliferation (SP+) had polyclonal T-cell activation (as shown by the study of T-cell receptor V β [TCR-V β] families) and an increase in the proportion of CD4 T cells expressing CD45RO.

MATERIALS AND METHODS

Patients. Fifty-eight asymptomatic HTLV-1-infected individuals studied at the HTLV-1 Reference Development of Science Foundation (Salvador, Bahia, Brazil) were included in the study. The group consisted of 47 women (81%) and 11 men (19%) and had a mean age of 43 years. Blood samples from 12 healthy

* Corresponding author. Mailing address: IASP/CPqGM/FIOCRUZ, Rua Waldemar Falcão, no. 121, Candeal, Salvador, Bahia CEP 40296-710, Brazil. Phone: 55 71-3356 8822. Fax: 55 71-3356 4320, ext. 300. E-mail: grassi@cpqgm.fiocruz.br.

TABLE 1. Spontaneous proliferation of PBMC from HTLV-1-infected individuals^a

PBMC	No. of HTLV-1-infected individuals	Mean cpm \pm SD (range)
SP+	39	1,656 \pm 956 (520-4,629)
SP-	19	217 \pm 152 (18-476)
Total	58	

^a The mean counts per minute of nonstimulated PBMC from uninfected controls was 159 \pm 138 cpm (range, 6 to 462 cpm). For HTLV-1-infected individuals, the mean cpm from nonstimulated cells was \geq 500 cpm at day 6 for individuals with SP+ PBMC, while it was \approx 500 cpm at day 6 for HTLV-1-infected individuals with SP- PBMC.

individuals from the Bahia State Blood Bank (HEMOBA) were used as controls. All samples were screened for HTLV-1/2 antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Ab-Capture ELISA test system; Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, New Jersey), and results were confirmed by Western blot assay (HTLV Blot 2.4; Genelabs Technologies, Singapore). Informed consent was obtained from all enrolled patients, and the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) ethics committee approved this study.

Media and reagents. RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was supplemented with 2 mM L-glutamine, 1% nonessential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and pooled human AB serum (10%) (Sigma).

Cells. PBMC from HTLV-1-infected individuals and healthy blood donors were obtained from heparinized venous blood samples by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). All experiments were performed with freshly isolated PBMC.

Flow cytometry. For direct labeling, 50- μ l portions of whole-blood samples from HTLV-1-infected individuals and healthy blood donors were incubated with antibodies for 30 min at room temperature. Erythrocytes were subsequently lysed with fluorescence-activated cell sorting (FACS) lysing solution (Becton-Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA). Cells were then washed three times in 2 ml of phosphate-buffered saline containing 1% bovine serum albumin. After a final wash, cells were fixed in phosphate-buffered saline containing 4% paraformaldehyde. In order to quantify CD4 and CD8 T cells, the following monoclonal antibodies were used: fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD3 (Immunotech, a Beckman Coulter Company), phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD4 (BD Pharmingen Technical), and phycoerythrin-cyanin-labeled anti-CD8 (Immunotech). To analyze CD4 T-cell memory and naive subsets, cells were stained with phycoerythrin-cyanin CD4, PE-labeled CD45RO, and FITC-labeled CD45RA (Immunotech). We studied TCR-V β repertoires in five HTLV-1-infected individuals with PBMC with spontaneous proliferation and five HTLV-1-infected individuals with PBMC without spontaneous proliferation (SP-). To study TCR-V β family expression on T lymphocytes, cells were analyzed for surface expression of peridinin chlorophyll protein-labeled anti-CD4 (clone RPA-T4; Becton Dickinson), PE-labeled anti-CD8 (clone RPA-T8; Becton Dickinson), and FITC-labeled anti-TCR-V β (clones V β 2 [E22E7.2], V β 3.1 [LE-89], V β 5.1 [IMMU 157], V β 5.2 [36213], V β 6.1 [CRI 304.3], V β 8 [56CS.2], V β 11 [C21], V β 12 [VER2.32.1], V β 13.1 [IMMU 222], V β 13.6 [JU-74], V β 16 [TAMAYA 1.2], V β 17 [E17.5F3.15.13], V β 20 [ELL 1.4], V β 21.3 [IG 125], and V β 22 [IMMU 546], Immunotech). Analyses were performed using a FACSort and Cell Quest software (Becton Dickinson, Mountain View, Calif.). At least 10³ events were analyzed per sample.

Antigen-specific and nonspecific proliferation assays. Antigen-specific and nonspecific proliferation assays were performed with unfractionated PBMC. The PBMC were cultured in RPMI 1640 culture medium with 10% AB serum, using 96-well U-bottom culture plates (Costar, Cambridge, MA) in triplicate at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere for 5 days. Briefly, 10⁵ cells/well were cultured in the presence of purified candidin (25 μ g/ml; Sanofi Pasteur, France), PPD of *Mycobacterium tuberculosis* (2 μ g/ml; Statens Serum Institute, Denmark), and CMV (10 μ g/ml; Behring, Marburg, Germany), all kindly provided by Brigitte Autran, and TF (1 μ g/ml) kindly provided by Daniel Scott, Institut Pasteur, Paris, France. Antigens were dialyzed and frozen prior to use. Controls consisted of supplemented medium. After 5 days of culture, cells were pulsed overnight with 1 μ Ci [³H]thymidine (specific activity, 2 Ci/mmol; ICN, Costa Mesa, CA). Incorporated [³H]thymidine was measured with a liquid scintillation beta counter (matrix 9600 direct beta counter; Packard). Results were expressed as mean counts per minute. The stimulation index represents the ratio of mean

TABLE 2. Percentages of T-cell subsets from HTLV-1-infected individuals and uninfected controls

Group and parameter	% T cells				CD4/CD8 ratio
	CD4 ⁺	CD4 ⁺ CD45RA ⁺ a	CD4 ⁺ CD45RO ⁺ b	CD8 ⁺	
Group A (SP+ HTLV-1-infected subjects [n = 19])					
Mean	41	29	79	24	1.7
SD	14	12	10	6	0.7
Median	44	30	79	23	2.0
Range	10-61	10-53	55-92	12-37	1.0-3.0
Group B (SP- HTLV-1-infected subjects [n = 10])					
Mean	43	32	67	21	2.5
SD	9	14	18	10	1.0
Median	45	31	68	19	2.5
Range	26-56	13-56	46-99	10-41	1.0-4.0
Group C (uninfected controls [n = 10])					
Mean	42	37	67	21	2.2
SD	9	11	11	4	0.8
Median	40	37	64	22	2.0
Range	31-55	23-57	51-86	15-30	1.0-4.0
P value^c					
Group A vs group B vs group C	0.84	0.36	0.02	0.20	0.09
Group A vs group B	0.84	0.65	0.04	0.12	0.07
Group A vs group C	0.60	0.15	0.01	0.27	0.18
Group B vs group C	0.65	0.43	0.85	0.31	0.49

^a CD4⁺ cells expressing CD45RA.

^b CD4⁺ cells expressing CD45RO.

^c Differences between the values for SP+ and SP- HTLV-1-infected groups and uninfected controls were compared by the Kruskal-Wallis test (group A versus group B versus group C). Differences between two groups were analyzed by the Mann-Whitney U test (group A versus group B, group A versus group C, and group B versus group C). Differences between the values for SP+ and SP- HTLV-1-infected groups and uninfected controls that were statistically significant are shown in bold type.

counts obtained in the presence of antigen to mean counts obtained without antigen. A stimulation index of \geq 3 indicated a positive proliferative response. Therefore, in this study, a mean counts per minute of \geq 500 for nonstimulated cells (i.e., three times the mean counts per minute for uninfected control nonstimulated cells, namely, 159 \pm 138 cpm; range, 6 to 462) was considered spontaneous proliferation of PBMC.

Statistical analyses. Data are expressed as means and standard deviations. We compared mean values of the percentages of CD4 and CD8 T-cell subsets and stimulation indexes of proliferative responses to recall antigen for the three groups (patients with spontaneous proliferation of PBMC, those without spontaneous proliferation, and controls) using the Kruskal-Wallis test. If a significant difference was found, a Mann-Whitney U test was performed. The statistical analysis of TCR-V β was performed by the Wilcoxon signed-rank test. A P value of less than 0.05 denoted a statistically significant difference. BioStat 3.0 software (Sociedade Civil Maminua/MCT-CNPq) was used for all statistical analyses.

RESULTS

PBMC spontaneous proliferation. As shown in Table 1, spontaneous PBMC proliferation was observed in 39 out of 58 (67%) HTLV-1-infected individuals (1,656 cpm \pm 956 cpm; range, 520 to 4,629 cpm).

On the other hand, no spontaneous PBMC proliferation was observed in 19 out of 58 (33%) HTLV-1-infected individuals (217 \pm 152 cpm; range, 18 to 476). In this case, the mean counts per minute for asymptomatic HTLV-1-infected individuals did not differ from the mean counts per minute for unin-

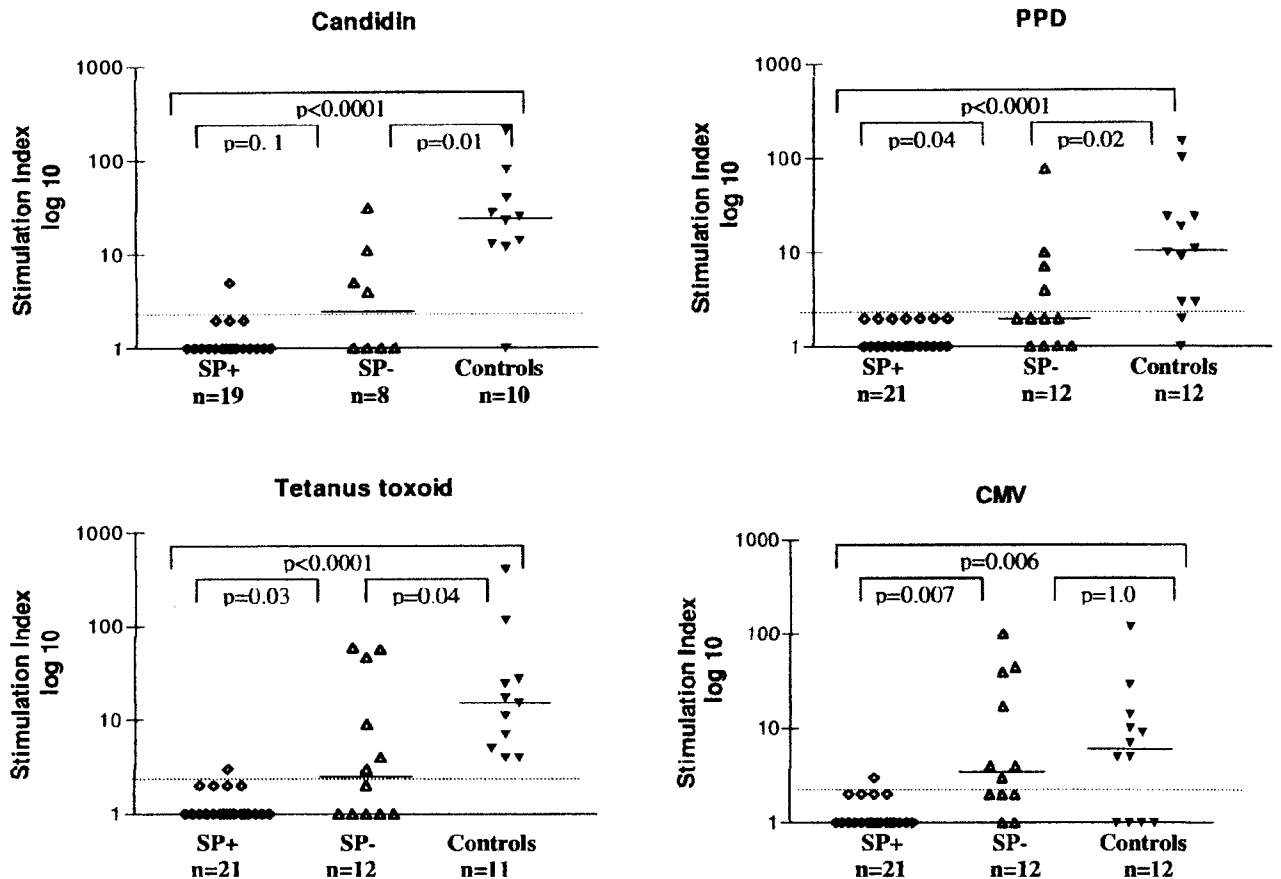


FIG. 1. Proliferative responses to recall antigens from HTLV-1-infected asymptomatic individuals with PBMC with and without spontaneous proliferation, respectively, and uninfected controls. PBMC were cultured in the presence of candidin, PPD, tetanus toxoid, and cytomegalovirus. At day 5 of culture, cells were pulsed overnight with 1 μ Ci [3 H]thymidine. Results are expressed as stimulation indexes (average counts per minute in the presence of antigens/average counts per minute obtained without antigen). Tests were carried out in triplicate. A stimulation index of ≥ 3 was considered positive for proliferative responses (above dashed lines). Bars depict median values. Differences were considered significant when P was <0.05 (Mann-Whitney U test).

ected controls (159 ± 138 cpm; range, 6 to 462) ($P = 0.32$ by the Mann-Whitney U test).

HTLV-1-infected individuals have an expansion of the memory CD4⁺ CD45RO⁺ T-cell subset. As shown in Table 2, the percentage of circulating CD4⁺ T lymphocytes in the HTLV-1-infected group with PBMC with spontaneous proliferation ($41\% \pm 14\%$) was similar to those of HTLV-1-infected individuals without spontaneous PBMC proliferation ($43\% \pm 9\%$) and of uninfected controls ($42\% \pm 9\%$) ($P = 0.84$). However, the memory CD4⁺ CD45RO⁺ T-cell subset was expanded in HTLV-1-infected individuals with spontaneous PBMC proliferation ($79\% \pm 10\%$) compared to that in HTLV-1-infected individuals without spontaneous proliferation ($67\% \pm 18\%$) ($P = 0.04$) and uninfected controls ($67\% \pm 11\%$) ($P = 0.01$). Additionally, the proportion of CD4 T cells expressing CD45RO was positively correlated to spontaneous proliferation of PBMC in culture (Spearman's $r = 0.37$; $P = 0.04$) (data not shown).

There were no significant differences in the frequencies of naive CD4⁺ CD45RA⁺ and CD8⁺ T-cell subsets in HTLV-

infected individuals (with or without spontaneous PBMC proliferation) and in uninfected controls.

PBMC from HTLV-1-infected individuals have a lower capacity to proliferate in response to recall antigens. HTLV-1-infected individuals with spontaneous proliferation showed the lowest stimulation indexes to all antigens tested (candidin, PPD, tetanus toxoid, and cytomegalovirus antigens) compared to HTLV-1-infected individuals without spontaneous proliferation and uninfected controls. Only 5.3% (1 out of 19) responded to candidin, while 4.8% (1 out of 21) responded to CMV or TT (Fig. 1). Besides that, HTLV-1-infected SP- patients also showed decreases in stimulation indexes: 50% of them (4 out of 8) responded to candidin, 33% (4 out of 12) responded to PPD, 42% (5 out of 12) to cytomegalovirus, and 50% (6 out of 12) to tetanus toxoid antigen. Almost all uninfected controls had positive responses to recall antigens: 90% to candidin (9 out of 10), 83% to PPD (10 out of 12), 100% to tuberculin (11 out of 11), and 67% (8 out of 12) to CMV.

In addition, PBMC from HTLV-1-infected individuals re-

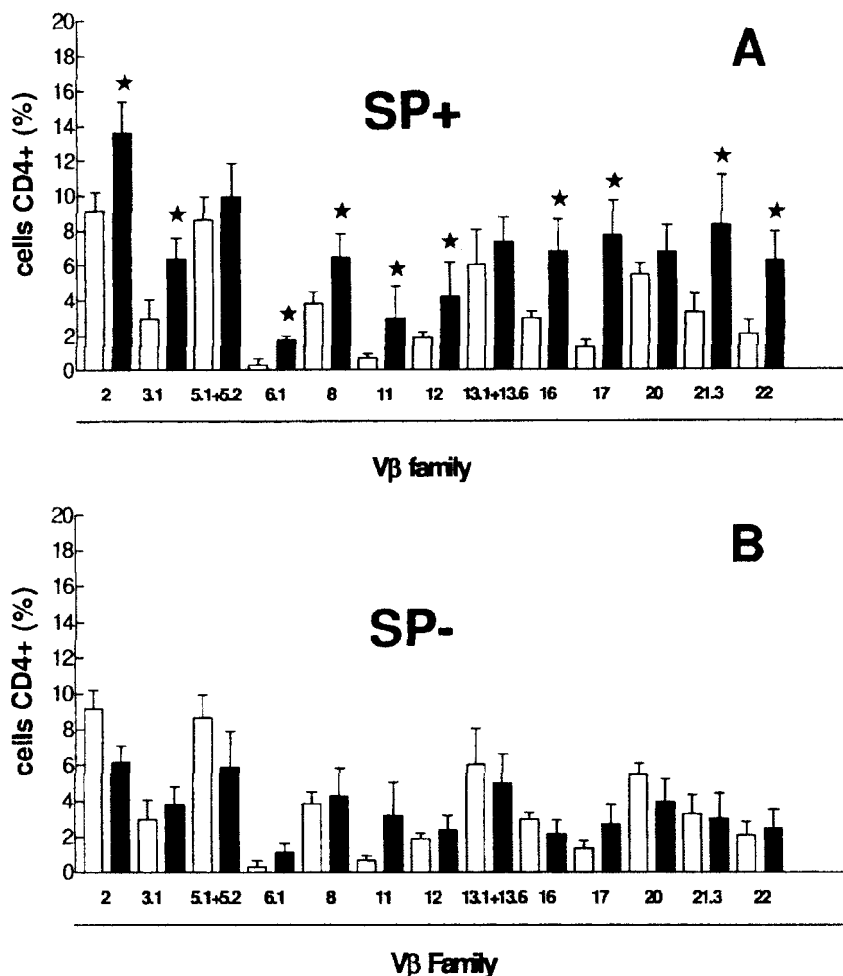


FIG. 2. TCR-V β repertoire from five SP⁺ and five SP⁻ HTLV-1-infected individuals. A total of 1×10^5 PBMC were analyzed for surface expression of CD4 TCR-V β family repertoire with specific monoclonal antibodies by flow cytometry. Analysis was performed on the FACScan using Cell Quest software. At least 10,000 events were analyzed per sample. Significant differences between uninfected controls and HTLV-1-infected individuals ($P < 0.05$ by the Wilcoxon signed-rank test) are indicated (*). (A) CD4⁺ T cells from 5 HTLV-1-infected patients with PBMC exhibiting spontaneous proliferation (black bars) and from 14 uninfected controls (white bars). (B) CD4⁺ T cells from 5 HTLV-1-infected patients with PBMC not exhibiting spontaneous proliferation (black bars) and from 14 uninfected controls (white bars).

sponded to fewer recall antigens than uninfected controls: while 83% of uninfected controls had specific PBMC proliferative responses to three or more different antigens, PBMC from HTLV-1-infected SP⁺ individuals were unable to recognize more than one antigen ($P < 0.0001$). Moreover, only 33% of HTLV-1-infected individuals without spontaneous PBMC proliferation responded to three or more antigens ($P = 0.038$).

TCR-V β analysis disclosed polyclonal expansion only in HTLV-1-infected individuals with spontaneous proliferation of PBMC. As shown in Fig. 2A, polyclonal expansion of CD4⁺ cells (TCR-V β families 2, 3.1, 6.1, 8, 11, 12, 16, 17, 21.3, and 22) was observed in patients with spontaneous PBMC proliferation. In contrast, HTLV-1-infected individuals without spontaneous PBMC proliferation had CD4 TCR-V β repertoires similar to those of uninfected individuals (Fig. 2B).

DISCUSSION

Spontaneous proliferation is an immunological hallmark of PBMC from HTLV-1-infected individuals. This phenomenon is observed in up to 50% of cultures from PBMC from HTLV-1 carriers (28). In this study, we evaluated the cellular immune responses from HTLV-1-infected individuals with PBMC showing and not showing spontaneous proliferation. Compared to uninfected controls, HTLV-1-infected individuals with PBMC presenting spontaneous proliferation had an increased proportion of CD4 T cells expressing CD45RO. Moreover, TCR-V β analysis showed a polyclonal expansion of almost all V β families studied concerning CD4 T-cell subsets. In addition, HTLV-1-infected individuals with spontaneous PBMC proliferation had markedly reduced stimulation indexes for candidin, PPD, tetanus toxoid, and cytomegalovirus.

Therefore, responses to these recall antigens could not be detected by cell proliferation.

The absence of detectable cellular immune responses to recall antigens in individuals with spontaneous PBMC proliferation was expected, since high levels of spontaneous proliferation would mask a specific response to the recall antigens evaluated by the stimulation index. However, previous findings support the idea that there could be different levels of T-cell energy among HTLV-1-infected individuals.

One of the most important observations of this study was that cells from HTLV-1-infected individuals with PBMC without spontaneous proliferation showed significant decreases in the stimulation indexes to candidin, PPD, and tetanus toxoid. In addition, only 33% were able to recognize more than two antigens; in contrast, 83% of uninfected controls were able to recognize three or more antigens. In those individuals, detectable expansion of CD4⁺ T lymphocytes was not identified by quantification of memory or naive CD4⁺ T-cell subsets, and analysis of TCR-V β by flow cytometry showed that their cells did not have polyclonal activation. Therefore, the mechanisms involved in the impairment of T lymphocytes from HTLV-1-infected individuals without spontaneous proliferation are unclear. These mechanisms could differ from those in HTLV-1-infected individuals with spontaneous PBMC proliferation. In addition, several other hypotheses are possible, such as the presence of regulatory T cells (9), impairment of antigen-presenting cells or inability of PBMC from HTLV-1-infected individuals to respond to interleukin-12 (32). Dendritic cells are the most potent antigen-presenting cells and produce interleukin-12, are targeted by HTLV-1, and stimulate the autologous proliferation of T lymphocytes *in vitro* (16, 18).

In conclusion, our results strongly suggest that HTLV-1-infected individuals show immunosuppression, as reflected by decreases in the stimulation indexes to recall antigens, even in individuals without spontaneous PBMC proliferation. The implication of these findings on the risk of HTLV-1-infected individuals developing other infectious diseases remains unknown. Further studies should be conducted in an attempt to clarify these questions.

ACKNOWLEDGMENTS

Support for this study was provided by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and the Fundação de Amparo a Pesquisa da Bahia (FAPESB).

We thank Lain Pontes de Carvalho for critical review of the manuscript. We also thank José Fernando O. Costa for technical assistance.

REFERENCES

- Chieffi, P. P., C. S. Chiatton, E. N. Feltrim, R. C. Alves, and M. A. Paschoalotti. 2000. Coinfection by *Strongyloides stercoralis* in blood donors infected with human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 in Sao Paulo City, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95:711-712.
- Dourado, L., L. C. Alcantara, M. L. Barreto, M. da Gloria Teixeira, and B. Galvao-Castro. 2003. HTLV-1 in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 34:527-531.
- Edlich, R. F., J. A. Arnette, and F. M. Williams. 2000. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1). *J. Emerg. Med.* 18:109-119.
- Galvao-Castro, B., L. Loures, L. G. Rodrigues, A. Sereno, O. C. Ferreira, Jr., L. G. Franco, M. Muller, D. A. Sampaio, A. Santana, L. M. Passos, and F. Proietti. 1997. Distribution of human T-lymphotropic virus type 1 among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion* 37:242-243.
- Gessain, A., F. Barin, J. C. Vernant, O. Gout, I. Maurs, A. Calender, and G. de The. 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-1 in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* ii:407-410.
- Hinuma, Y., K. Nagata, M. Hanaoka, M. Nakai, T. Matsumoto, K. I. Kinoshita, S. Shirakawa, and I. Miyoshi. 1981. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6476-6480.
- Hollberg, P., and D. A. Haller. 1993. Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 328:1173-1182.
- Ijichi, S., T. Matsuda, I. Maruyama, T. Izumibara, K. Kojima, T. Nimura, Y. Maruyama, S. Sonoda, A. Yoshida, and M. Osame. 1990. Arthritis in a human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) carrier. *Ann. Rheum. Dis.* 49:718-721.
- Iwashiro, M., R. J. Messer, K. E. Peterson, I. M. Stromnes, T. Sugie, and K. J. Hasenkrug. 2001. Immunosuppression by CD4⁺ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:9226-9230.
- Kaplan, M. H. 1993. Human retroviruses and neoplastic disease. *Clin. Infect. Dis.* 17(Suppl. 2):S400-S406.
- Kashala, O., R. Marlink, M. Hanga, M. Diese, B. Gormus, K. Xu, P. Mukoba, K. Kasongo, and M. Essex. 1994. 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.* 169:296-304.
- Kitajima, I., I. Maruyama, Y. Maruyama, S. Ijichi, N. Eiraku, Y. Mimura, and M. Osame. 1989. Polyarthritides in human T lymphotropic virus type 1-associated myelopathy. *Arthritis Rheum.* 32:1342-1344.
- Kramer, A., S. Jacobson, J. F. Reuben, E. L. Murphy, S. Z. Wiktor, B. Cranston, J. P. Figueroa, B. Hanchard, D. McFarlin, and W. A. Blattner. 1989. Spontaneous lymphocyte proliferation in symptom-free HTLV-1 positive Jamaicans. *Lancet* ii:923-924.
- Kuroda, Y., and H. Takashima. 1990. Impairment of cell-mediated immune responses in HTLV-1-associated myelopathy. *J. Neurol. Sci.* 100:211-216.
- LaGrenade, L., B. Hanchard, V. Fletcher, B. Cranston, and W. Blattner. 1990. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-1 infection. *Lancet* 336:1345-1347.
- Macatonia, S. E., J. K. Cruickshank, P. Rudge, and S. C. Knight. 1992. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 8:1699-1706.
- Madeleine, M. M., S. Z. Wiktor, J. J. Goedert, A. Manns, P. H. Levine, R. J. Biggar, and W. A. Blattner. 1993. HTLV-1 and HTLV-II world-wide distribution: reanalysis of 4,832 immunoblot results. *Int. J. Cancer* 54:255-260.
- Makino, M., S. Shimokubo, S. I. Wakamatsu, S. Izumo, and M. Baba. 1999. The role of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-infected dendritic cells in the development of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Virol.* 73:4575-4581.
- Marsh, B. J. 1996. Infectious complications of human T cell leukemia/lymphoma virus type 1 infection. *Clin. Infect. Dis.* 23:138-145.
- Mochizuki, M., K. Yamaguchi, K. Takatsuki, T. Watanabe, S. Mori, and K. Tajima. 1992. HTLV-1 and uveitis. *Lancet* 339:1110.
- Morceira, E. D., Jr., T. T. Ribeiro, P. Swanson, C. Sampaio Filho, A. Melo, C. Brites, R. Badaro, G. Toedter, H. Lee, and W. Harrington, Jr. 1993. Seroprevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1/II in northeastern Brazil. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 6:959-963.
- Morgan, O. S., P. Rodgers-Johnson, C. Mora, and G. Char. 1989. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet* ii:1184-1187.
- Murai, K., N. Tachibana, S. Shioiri, E. Shishime, A. Okayama, J. Ishizaki, K. Tsuda, and N. Mueller. 1990. Suppression of delayed-type hypersensitivity to PPD and PHA in elderly HTLV-1 carriers. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 3:1006-1009.
- Osame, M., K. Usuku, S. Izumo, N. Ijichi, H. Amitani, A. Igata, M. Matsumoto, and M. Tara. 1986. HTLV-1 associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* i:1031-1032.
- Pedral-Sampaio, D. B., E. Martins Neto, C. Pedrosa, C. Brites, M. Duarte, and W. Harrington, Jr. 1997. Co-infection of tuberculosis and HIV/HTLV retroviruses: frequency and prognosis among patients admitted in a Brazilian hospital. *Braz. J. Infect. Dis.* 1:31-35.
- Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:7415-7419.
- Popovic, M., N. Flomenberg, D. J. Volkman, D. Mann, A. S. Fauci, B. Dupont, and R. C. Gallo. 1984. Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-1 or HTLV-II. *Science* 226:459-462.
- Prince, H. E., H. Lee, E. R. Jensen, P. Swanson, D. Weber, L. Fitzpatrick, M. Doyle, and S. Kleinman. 1991. Immunologic correlates of spontaneous lymphocyte proliferation in human T-lymphotropic virus infection. *Blood* 78:169-174.
- Prince, H. E., J. York, S. M. Owen, and R. B. Lal. 1995. 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-1 versus HTLV-II. *Clin. Exp. Immunol.* 102:256-261.
- Robinson, R. D., J. F. Lindo, F. A. Neva, A. A. Gam, P. Vogel, S. I. Terry, and

- E. S. Cooper. 1994. Immunoepidemiologic studies of *Strongyloides stercoralis* and human T lymphotropic virus type I infections in Jamaica. *J. Infect. Dis.* **169**:692-696.
31. Setoguchi, Y., S. Takahashi, T. Nukiwa, and S. Kira. 1991. Detection of human T-cell lymphotropic virus type I-related antibodies in patients with lymphocytic interstitial pneumonia. *Am. Rev. Respir. Dis.* **144**:1361-1365.
32. Suzuki, M., C. S. Dezzutti, A. Okayama, N. Tachibana, H. Tsubouchi, N. Mueller, and R. B. Lal. 1999. Modulation of T-cell responses to a recall antigen in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**:713-717.
33. Tachibana, N., A. Okayama, J. Ishizaki, T. Yokota, E. Shishime, K. Murai, S. Shioiri, K. Tsuda, M. Essex, and N. Mueller. 1988. Suppression of tuberculin skin reaction in healthy HTLV-I carriers from Japan. *Int. J. Cancer* **42**:829-831.
34. Uchiyama, T., J. Yodoi, K. Sagawa, K. Takatsuki, and H. Uchino. 1977. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **50**:481-492.
35. Vrielink, H., and H. W. Reesink. 2004. HTLV-1/II prevalence in different geographic locations. *Transfus. Med. Rev.* **18**:46-57.
36. Welles, S. L., N. Tachibana, A. Okayama, S. Shioiri, S. Ishibara, K. Murai, and N. E. Mueller. 1994. Decreased reactivity to PPD among HTLV-I carriers in relation to virus and hematologic status. *Int. J. Cancer* **56**:337-340.