



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA PROLIFERAÇÃO ESPONTÂNEA
EM PBMC DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1
POR CITOMETRIA DE FLUXO**

LORENA ANA PINTO

**Salvador - Bahia – Brasil
2010**



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA PROLIFERAÇÃO ESPONTÂNEA
EM PBMC DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1
POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz como partes dos requisitos para obtenção de título de mestre em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

LORENA ANA PINTO

Orientadora: Dra. Maria Fernanda Rios Grassi

**Salvador - Bahia – Brasil
2010**

**AVALIAÇÃO *EX VIVO* DA PROLIFERAÇÃO ESPONTÂNEA EM
PBMC DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1 POR
CITOMETRIA DE FLUXO**

Lorena Ana Pinto

Comissão Examinadora:

Dra. Milena Botelho Soares
Pesquisadora Associada
CPqGM-Fiocruz/BA

Dra. Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas
Pesquisadora Visitante
CPqGM-Fiocruz/BA

Aos meus pais Antônio José (*in memoriam*) e Doralice, a meus irmãos Anselmo e Érica, minha razão de viver.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Fernanda Grassi, pela orientação nesse estudo, pelos princípios passados, pela confiança, amizade e pela paciência.

Ao Dr. Galvão pela oportunidade de trabalhar no Centro de HTLV.

Aos pacientes pela generosa colaboração.

À equipe do Centro de HTLV, em especial Noílson e Sônia.

À todos do grupo Imuno-HTLV, em especial Dra. Rita Elizabeth pela sua agradável companhia, amizade e ensinamentos.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fiocruz e a equipe do LASP pela possibilidade de desenvolver esse estudo.

À coordenação de ensino, em especial Taise Coutinho pela inúmeras solicitações atendidas.

À Jorge Clarêncio e Daniela, pelo empenho, paciência e bom humor oferecidos na citometria de fluxo.

A Deus pela oportunidade de viver e crer na sua existência.

A minha família, pais e irmãos que são minha fonte de inspiração, e que tanto me orgulham, pela formação de meu caráter com os exemplos de humildade, generosidade, lealdade, amizade e amor ao próximo.

À Giulliano Quintella, pelo amor oferecido, pelo companheirismo, paciência, apoio e pelo incansável incentivo.

Aos colegas da pós-graduação, pela alegria nas aulas, em especial Adenizar Delgado, Ane Emanuelle, Gabrielli Manzoli, Lúcio Barbosa, Eliomara Alves e Wendell Villas Boas hoje grandes amigos.

Ao mestres Djalma Carvalho e Arthur Dias, pelo incentivo e apoio sempre.

À professora Mírian Guerra, pela indicação perfeita e por acreditar em minha capacidade sempre.

Aos meus amigos Andreza Garcia, Jamille Azevedo, Jaqueline Freitas, Jéssica Mirella, Mizael Cortes, Pollyana Portela e Saulo Fonseca pela verdadeira amizade e pelo apoio mesmo estando distante geograficamente.

A todos aqueles cujos nomes não estão aqui citados, mas que muito ajudaram pelo simples fato de serem meus amigos.

RESUMO

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) infecta cerca de 2% da população de Salvador-Bahia. O HTLV-1 é o agente etiológico da ATLL, HAM/TSP e uveíte. Este vírus também está relacionado a outras doenças inflamatórias como artrites, dermatites infectivas, polimiosites, alveolites e Síndrome de Sjögren. Uma das características imunológicas mais marcantes da infecção pelo HTLV-1 é a proliferação espontânea dos linfócitos T induzida por proteínas transativadoras virais, como Tax e HBZ. O papel da proliferação na patogênese da infecção não é conhecido, porém alguns trabalhos indicam que sua intensidade é maior nos pacientes com HAM/TSP, além disso pode ser responsável pela manutenção da carga proviral do HTLV-1, uma vez que o vírus se replica por divisão da célula infectada. A dinâmica da proliferação *ex vivo* não é muito conhecida, sendo normalmente avaliada por adição de $^3\text{[H]}$ -Timidina às culturas, que possui várias desvantagens, entre as quais a toxicidade. Este é um estudo piloto que objetivou padronizar um método para avaliação da dinâmica da proliferação espontânea de linfócitos T utilizando o marcador *CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester* (CFSE), por citometria de fluxo. Além de quantificar os índices de proliferação celular de linfócitos T totais e das subpopulações linfocitárias T CD4+ e T CD8+, correlacionar proliferação celular com a carga proviral do HTLV-1 e a expressão da proteína viral TAX. Para tal, PBMC de 30 pacientes infectados pelo HTLV-1 (16 assintomáticos e 14 HAM/TSP) foram cultivados por 24, 48, 72, 96 e 120 horas, em presença de CFSE. As células foram adquiridas em citometro de fluxo e os resultados analisados pelo programa FlowJo, através da porcentagem de células divididas e do índice de divisão celular. Observou-se proliferação em 66,7% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1. A proliferação espontânea de PBMC foi superior no grupo de pacientes com HAM/TSP (porcentagem de células divididas: 79%, índice de divisão celular: 79%), comparada aos assintomáticos (porcentagem de células divididas: 50%, índice de divisão celular: 56,3%), porém essa diferença não foi significativa. A proliferação espontânea pode ser detectada nas primeiras 24 horas de cultura. A intensidade de proliferação é semelhante para as subpopulações de linfócitos T CD4 e T CD8, tanto em indivíduos assintomáticos como naqueles com HAM/TSP. Não houve correlação entre a carga proviral e a porcentagem de células divididas ($r = -0,009$; $p = 0,9$) e índice de divisão celular ($r = 0,1$; $p = 0,5$). A média de expressão de TAX em linfócitos TCD4+ foi de $2,4 \pm 2,4$ %. Houve correlação entre a expressão da proteína Tax e a porcentagem de células divididas ($r = 0,59$; $p = 0,05$) e o índice de divisão celular ($r = 0,60$; $p = 0,05$), porém sem significância estatística. No entanto, encontrou-se uma correlação positiva entre a porcentagem de células T CD4+ divididas e a expressão da proteína Tax ($r = 0,79$; $p < 0,003$), bem como entre o índice de divisão das células TCD4+ e a expressão da proteína Tax ($r = 0,75$; $p = 0,008$). Em conclusão, a avaliação da proliferação espontânea por citometria de fluxo, em culturas com CFSE avaliadas pelo programa FlowJo permite identificar a proliferação celular nas 24 horas iniciais da cultura e quantificar a proporção de linfócitos T CD4 e TCD8 que proliferam. Este método pode ser útil na avaliação de drogas que modulam a proliferação espontânea em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Palavras chaves: HTLV, proliferação espontânea, citometria de fluxo, *ex vivo*

ABSTRACT

Around 2% of the population of Salvador-Bahia are infected by the Human-T Lymphocyte virus type I (HTLV-1). This virus is the etiologic agent of ATLL, HAM/TSP and uveitis. It is also related to inflammatory illness like arthritis, infective dermatitis, polymyositis, alveolitis and Sjorgen syndrom. The spontaneous proliferation of T-lymphocytes induced by viral transactivating proteins like Tax and HBZ is one of the most outstanding immunological characteristics of the infection. The role of the proliferation in the pathogenesis is still unknown though some studies have shown that it is higher among HAM/TSP patients. Moreover, it could be responsible for the HTLV-1 remaining proviral load since the virus replicate through division of infected cell. The dynamics of the proliferation *ex-vivo* is not well known and is usually assessed by incorporating ³[H]-Thymidine to the cultures. This method has several disadvantages one of them being the ³[H]-Thymidine toxicity. This pilot study was aimed at the standardization of a method that assesses the dynamics of the spontaneous T-lymphocytes proliferation using flow cytometry and *CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester* (CFSE) as a marker. Other objectives were to assess the rates of celular proliferation of both total T lymphocytes and CD4+ and T CD8+ subpopulations; to correlate the celular proliferation with the HTLV-1 viral load and the expression of the viral TAX protein. PBMCs of 30 HTLV-1 infected patients (16 asymptomatic and 14 HAM/TSP) were cultivated for 24, 48, 72, 96 and 120 hours in the presence of CFSE. Cells were obtained by flow cytometry and the results were analysed with the software Flowjo through the percentage of divided cells and the rate of celular division. Cell proliferation was observed in 66.7% of the HTLV-1 infected people. The PBMC spontaneous proliferation was higher in the group of HAM/TSP patients (percentage of divided cells:79%, rate of celular division79%) compared to the asymptomatic individuals (percentage of divided cells: 50%, rate of celular division: 56,3%) though this difference was not significant. Spontaneous proliferation can be detected in the first 24 hours of cell cultivation. The intensity of proliferation is similar in T CD4 e T CD8 subpopulations of assympomatic individuals and HAM/TSP patients. There was no correlation between proviral load and percentage of divided cells ($r= -0,009$; $p= 0,9$) and the rate of celular division ($r=0,1$; $p=0,5$). The average of the TAX expression in T CD4+ was $2,4\pm 2,4$ %. There was a correlation between the expression of TAX protein and the percentage of divided cells ($r=0,59$; $p =0,05$) and the rate of celular division ($r=0,60$; $p=0,05$), although not statistically significant. Nevertheless, a positive correlation was found between the percentage of divided T CD4+ cells and the expression of TAX protein ($r=0,79$; $p<0,003$), as well as between the rate of celular division of TCD4+ cells and the expression of TAX protein ($r=0,75$; $p=0,008$). As a conclusion, the assessment of spontaneous proliferation by flow cytometry in cultures with CFSE analysed with the FlowJo software allows to identify the celular proliferation in the first 24 hours of cultivation and to quantify the proportion of T CD4 and TCD8 lymphocytes that proliferated. This method could be usefull to assess drugs that modulate the spontaneous proliferation in PBMCs from HTLV-1 infected individuals.

Key words: HTLV, spontaneous proliferation, flow cytometry, ex vivo

LISTA DE FIGURAS

Figura I. Perfil das amostras marcadas com CFSE e analisadas pelo programa FlowJo..	17
Figura 1. Organização genética do vírus HTLV-1	03
Figura 2. Estrutura morfológica do HTLV-1	04
Figura 3. Distribuição da infecção pelo HTLV-1 no mundo	05
Figura 4. Prevalência da infecção pelo HTLV-1 e 2 no Brasil	06
Figura 5. Cinética da proliferação espontânea dos linfócitos T em indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e com HAM/TSP determinado por citometria de fluxo	22
Figura 6. Avaliação da proliferação espontânea de linfócitos T em indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e com HAM/TSP determinado por citometria de fluxo	24
Figura 7. Avaliação da proliferação espontânea de linfócitos T CD4+ e T CD8+ em indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e com HAM/TSP determinado por citometria de fluxo	26
Figura 8. Correlação entre proliferação celular e carga proviral de indivíduos infectados pelo HTLV-1	27
Figura 9. Avaliação da expressão da proteína TAX em linfócitos T CD4+ de indivíduos infectados pelo HTLV-1	28
Figura 10. Correlação entre proliferação celular e expressão intracelular de TAX em linfócitos T CD4+ de indivíduos infectados pelo HTLV-1	30
Figura 11. Correlação entre proliferação celular de linfócitos T CD4+ e expressão intracelular de TAX em linfócitos T CD4+ de indivíduos infectados pelo HTLV-1	31

Figura 12. Correlação entre proliferação celular de linfócitos T CD8+ e expressão intracelular de TAX em linfócitos T CD4+ de indivíduos infectados pelo HTLV-132

Figura 13. Correlação entre a expressão intracelular de TAX em linfócitos T CD4+ e a carga proviral de indivíduos infectados pelo HTLV-133

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Características gerais dos indivíduos infectados pelo HTLV-1.....	20
Tabela 02. Número e proporção de indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e HAM/TSP que apresentam proliferação espontânea segundo os índices determinados com CFSE e analisados pelo programa FlowJo.....	23
Tabela 03. Proporção de linfócitos T CD4+ produtores de TAX em indivíduos infectados pelo HTLV-1.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

ATLL	Leucemia de células T do adulto
CD	Marcador de membrana celular
CFSE	<i>CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester</i>
GLUT	Transportador de Glicose
GMS-CFS	Fator estimulante de colônia granulócito/macrófago
HAM/TSP	Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espática Tropical
HLA-DR	Antígenos leucocitários humanos de classe II, DR
HTLV	Vírus Linfotrópico das Células T Humana
INF	Interferon
IL	Interleucina
IL-2R	Receptor de Interleucina-2
LTR	Sequências terminais repetitivas
μL	Microlitro
mL	Mililitro
NF-kB	Fator de transcrição nuclear (nuclear factor kappa B)
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
SMAC	Agrupamento de ativação molecular
TGF	Fator de crescimento e transformação
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	01
1.1 INTRODUÇÃO	01
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	03
1.2.1 História e Estrutura	03
1.2.2 Epidemiologia	04
1.2.3 Doenças Associadas	07
1.2.4 Proliferação Celular Espontânea	08
1.2.5 Carga Proviral	11
1.2.6 Tratamento	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Desenho Experimental	15
3.2 Pacientes	15
3.3 Cultura Celular	15
3.4 Ensaio de Linfoproliferação	16
3.5 Quantificação da expressão de TAX	18
3.6 Quantificação da Carga Proviral do HTLV-1	18
3.7 Análises Estatísticas	19
4. RESULTADOS	20
4.1 Características Gerais dos Pacientes	20

4.2 Análise da Proliferação Espontânea dos Linfócitos T	21
4.3 Análise da Proliferação Espontânea das Subpopulações Linfocitárias T CD4+ e T CD8+	25
4.4 Correlação entre Proliferação Celular e a Carga Proviral do HTLV-1	27
4.5 Correlação entre Proliferação Celular e a Expressão da Proteína TAX	28
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES	37
7. PERSPECTIVAS	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. APRESENTAÇÃO

1.1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo HTLV-1 é considerada um problema de saúde pública, com 10 a 20 milhões de indivíduos infectados em todo o mundo, principalmente em países subdesenvolvidos. Este vírus infecta populações com níveis de renda e escolaridade inferiores e não existe vacina ou um tratamento específico, por isso pode ser considerada como uma doença negligenciada. O tratamento é sintomático e restrito aos pacientes que apresentem alguma doença associada à infecção viral. Uma característica marcante da infecção pelo HTLV-1 é que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) dos indivíduos infectados proliferam espontaneamente, ou seja, na ausência de antígeno ou de suplementação de citocinas, como por exemplo IL-2. As PBMC, estimuladas pela proteína TAX do HTLV-1 produziram uma maior quantidade de citocinas envolvidas no ciclo celular como IL-2, IL-15, GM-CSF, entre outros. Além disso, a TAX ativa protooncogenes e proteínas do ciclo celular estimulando a divisão das células. A intensidade da proliferação espontânea tem sido descrita como maior nos indivíduos com HAM/TSP e pode igualmente ser responsável pela manutenção da carga proviral nos indivíduos infectados. A dinâmica da proliferação espontânea, *ex vivo*, não é bem conhecida. Os modelos para avaliar esta proliferação utilizam na sua maioria a incorporação de $^3\text{[H]}$ -Timidina, substância radioativa que não permite avaliar por exemplo, o fenótipo das células envolvidas ou quantificar a proporção de células que proliferam.

Partindo do pressuposto que o tratamento atual das doenças associadas ao HTLV-1 é oneroso, tóxico e pouco eficaz e sendo a proliferação espontânea o evento mais característico promovido pelo HTLV, justifica-se a necessidade de padronizar um modelo mais sensível para a avaliação da proliferação espontânea, no qual fosse possível quantificar a proporção de células envolvidas bem como o fenótipo nessa proliferação. Para tal utilizamos o método de incorporação de *CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester* (CFSE) à membrana celular, de maneira não tóxica, no

qual as células marcadas podem ser cultivadas e a proliferação avaliada pela quantidade de fluorescência emitida pela membrana celular após as divisões celulares. A intensidade de proliferação pode ser quantificada em momentos diferentes (horas e dias). Por este método pode-se ainda medir a proliferação de diferentes populações celulares e correlacionar esses resultados à carga proviral do HTLV, bem como a expressão de proteínas virais. Pode-se ainda verificar as alterações imunes através de análises de ativação do fenótipo celular.

A padronização deste método nos permite avaliar - de modo mais refinado - a dinâmica de proliferação bem como a ação de drogas sobre a modulação da proliferação espontânea de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV.

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 História e Estrutura

O Vírus Linfotrófico de Célula T Humana do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus envelopado incluído na família *Retroviridae*, sub-família *Oncovirinae*, gênero *Delta-virus*. (Kohtz *et al.* 1988). Poiesz e colaboradores em 1980 descreveram o HTLV-1 como o primeiro retrovírus humano. O vírus foi isolado a partir de uma linhagem de células linfoblastóides obtidas de PBMC de um paciente com linfoma cutâneo de células T. Posteriormente, foi isolado o HTLV-2 a partir de células de um paciente com uma leucemia descrita como “Tricoleucemia de células T” (Kalyanaraman *et al.* 1982). Menos patogênico que o HTLV-1, o tipo 2 não apresenta associação definida com nenhuma doença linfoproliferativa (Roucoux e Murphy 2004). Têm sido descritos recentemente outros dois tipos do mesmo vírus, HTLV do tipo 3 e do tipo 4, isolados em amostras de sangue de moradores de Camarões na África (Calattini *et al.* 2005; Wolfe *et al.* 2005).

A estrutura genética do HTLV consiste em três genes estruturais clássicos similares à dos demais retrovírus, sendo estes: *gag* (grupo antígeno específico do core), *pol* (polimerase) e *env* (envelope). O HTLV apresenta também uma região pX - que codifica proteínas acessórias e regulatórias. As proteínas regulatórias são TAX, Rex e HBZ. Duas sequências terminais longas idênticas (LTR) flanqueiam o genoma viral (Kohtz *et al.* 1988) (**Figura 1**).

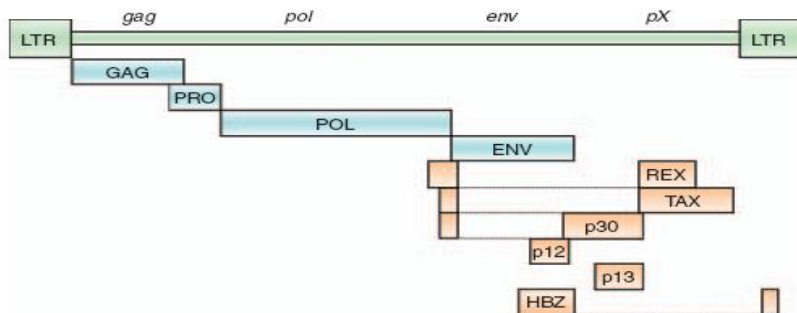


Figura 1: Organização genética do vírus HTLV-1. Fonte: Boxus e Willems 2009.

Seu genoma possui duas fitas de RNA simples envolvidas por um envelope viral, constituído pela glicoproteína gp21, codificada por *env*, que também codifica gp46, uma glicoproteína presente na superfície do envelope viral. As proteínas de matriz (p19), do capsídeo (p24) e do nucleocapsídeo (p15) são codificadas por *gag*. O gene *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa (p55), endonucleases e integrases (p32) (Figura 02).

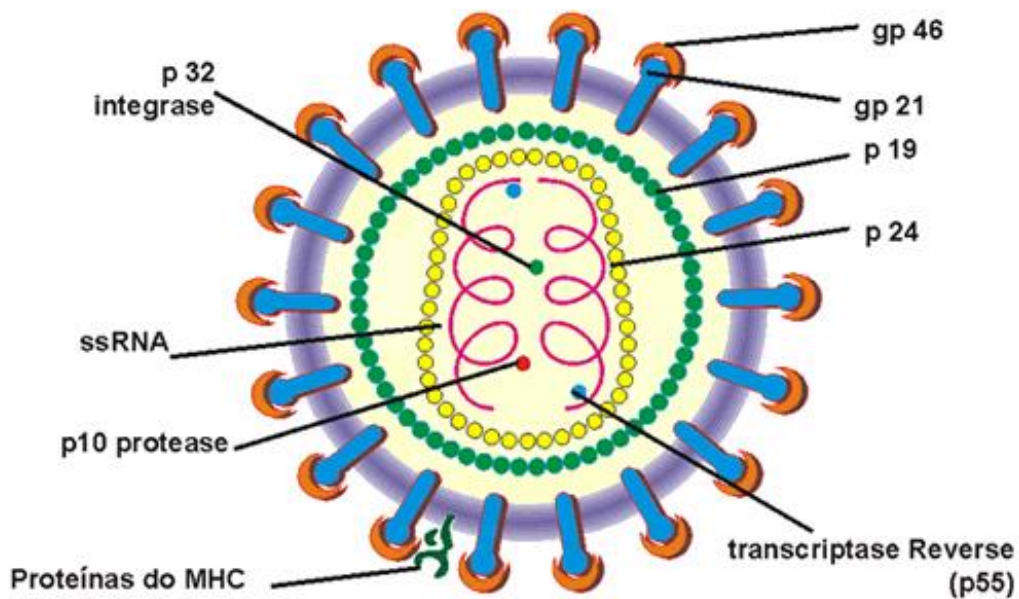


Figura 02: Estrutura morfológica do HTLV-1. Fonte: www.htlv.com.br

1.2.2 Epidemiologia

O HTLV está distribuído geograficamente de forma endêmica, porém essa prevalência não é uniforme podendo variar de uma região, de um país. O vírus que foi primeiramente descrito nos Estados Unidos é encontrado em diversas partes do mundo, como as áreas endêmicas do sul do Japão, ilhas do Caribe, África, América Central e América do Sul (Edlich *et al.* 2000). Estas regiões apresentam alta prevalência da infecção e acredita-se que o número de infectados pelo HTLV no mundo seja

aproximadamente 10 a 20 milhões de indivíduos (de Thé and Bomford, 1993) (**Figura 03**). A soroprevalência parece aumentar com a idade, e apresenta-se maior em mulheres que em homens. (Catalan-Soares *et al.* 2001). O Japão foi à primeira região a ser identificada como área endêmica para o vírus, sendo a área com maior número de dados sobre aspectos epidemiológicos e clínicos relacionados ao HTLV-1 (Goto *et al.* 1997). Desde 1982, a região do Caribe é conhecida como área endêmica para o HTLV-1, apresentando em média 5% da população soropositiva para este vírus (Blattner *et al.* 1982; Catalan-Soares *et al.* 2001). Na África há uma grande diferença nas taxas de prevalência nos estudos relatados, explicados pela grande variação nos testes diagnósticos e pela quantidade de testes sem confirmação entre outros fatores.

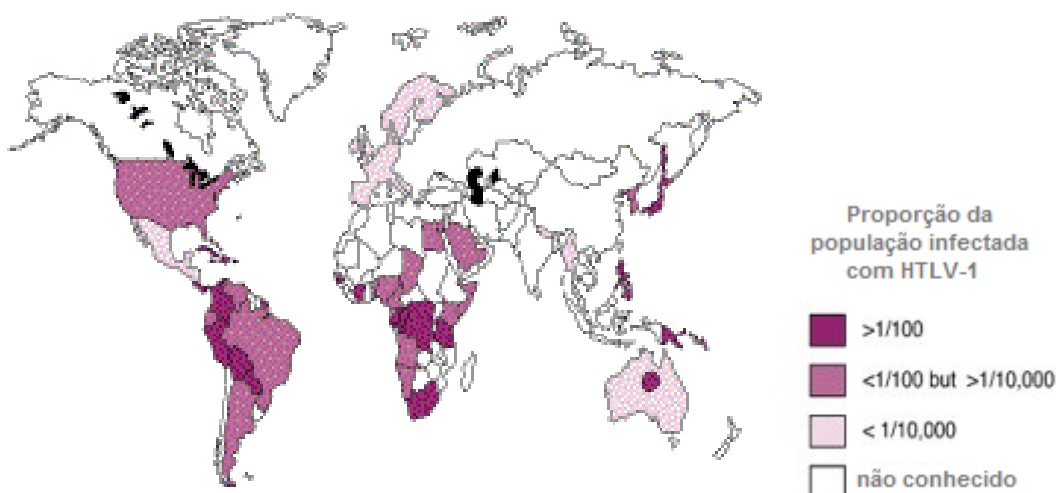


Figura 03: Distribuição da infecção pelo HTLV-1 no mundo. Fonte: adaptado de www.htlv1.eu

Diferentes prevalências da infecção pelo HTLV-1 têm sido relatadas nos países sul-americanos. No Brasil essa prevalência é variável, segundo a região estudada e o grupo avaliado (**Figura 04**). Galvão-Castro em 1997, em um estudo multicêntrico em doadores de sangue, descreveu essa infecção em cinco capitais de diferentes regiões do país. A cidade de Salvador-Bahia apresentou 1,35% de prevalência, sendo a maior taxa

de infecção do país. Nesta cidade, a prevalência na população geral é de cerca de 2%, aumentando com a idade e podendo chegar a 10% em mulheres acima de 50 anos (Dourado *et al.* 2003). O HTLV-1 foi igualmente relatado em outras localidades deste Estado. Em um estudo com gestantes em Cruz das Almas-Bahia, uma cidade de médio porte do Recôncavo da Bahia, foi encontrada 0,98% de prevalência (Magalhães *et al.* 2008). Rego e colaboradores em 2008 sugerem que a infecção pelo HTLV-1 está se espalhando de Salvador para outras regiões do estado da Bahia, com prevalências variando entre 1,23% -3,85% em cidades da região do Vale do São Francisco.

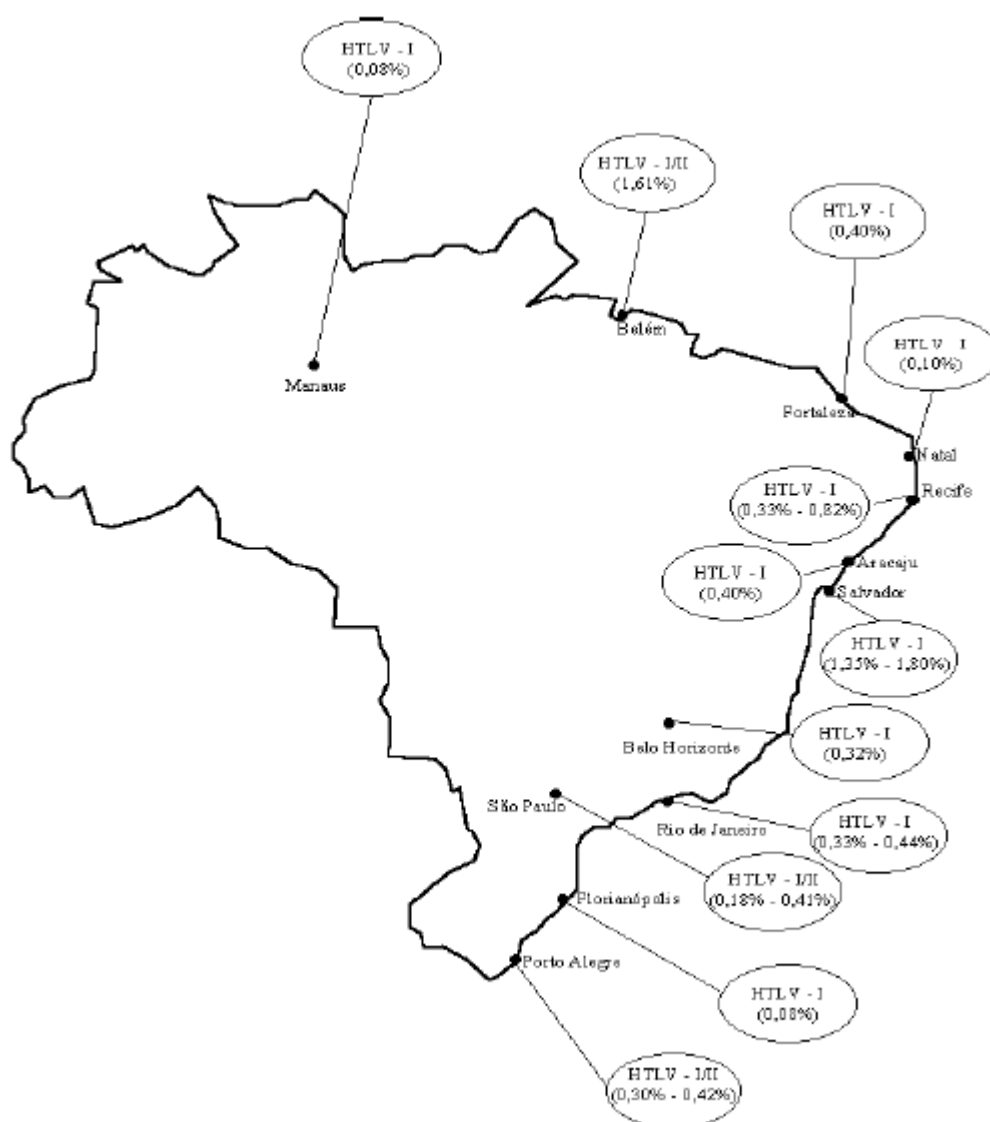


Figura 04: Prevalência da infecção pelo HTLV-1 e 2 no Brasil. Fonte: Carneiro-Proietti *et al.* 2002.

1.2.3 Doenças Associadas

A grande maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanecerá como portador assintomático. Cerca de 5-10% desses infectados poderão desenvolver patologias associadas ao vírus tipo 1 (Hollberg e Hafler, 1993). Entretanto, embora sem sintomas, os indivíduos infectados são capazes de transmitir o vírus, uma vez que o genoma proviral esteja integrado na sequência de DNA da célula hospedeira.

A infecção pelo vírus está ligada a um grande número de doenças clínicas. A primeira doença de progressão rápida associada ao HTLV-1 foi a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) (Hinuma *et al.* 1981). A probabilidade de um indivíduo infectado desenvolver ATL é de 1-5% (Murphy *et al.* 1989) e sua maior incidência acontece a partir da terceira década de vida, entre os 40-70 anos. A ATL é variável dependendo da forma clínica apresentada, com o tempo de vida variando de semanas a no máximo um ano. A ATL é caracterizada por uma expansão clonal de linfócitos T CD4+ ativados. (Takatsuki *et al.* 1994)

A paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV (HAM/TSP), uma mieloneuropatia progressiva é caracterizada por lesão inflamatória e desmielinizante dos neurônios motores longos da medula (Hinuma *et al.* 1981, Gessain *et al.* 1985). Os sintomas desta doença aparecem entre a quarta e a quinta década de vida, mulheres são mais frequentemente afetadas que homens, numa razão de 2:1 (Osame *et al.* 1990). Pacientes que desenvolvem HAM/TSP apresentam uma fraqueza crônica e progressiva dos membros inferiores com espasticidade, distúrbios esfinterianos, hiperreflexia, sinais sensitivos reflexivos carentes ou ausentes. Em 1988 a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization – WHO*) elaborou critérios de diagnóstico para esta doença. Recentemente, em 2006, Castro-Costa e colaboradores reuniram-se para discutir e propor um novo modelo de diagnóstico, no qual foram propostos três níveis para a determinação de HAM/TSP sendo estes provável, possível e definido, de acordo com os sintomas neurológicos, resultados sorológicos e/ou detecção do HTLV-1/DNA e exclusão de outras desordens.

O HTLV-1 também está relacionado a outras doenças inflamatórias como uveítes, artrites, dermatite infecciosa, polimiosites, alveolites e Síndrome de Sjogren (Morgan *et al.* 1989; Ijichi *et al.* 1990; LaGrenade *et al.* 1990; Mochizuki *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, *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 *et al.* 1993; Pedral-Sampaio *et al.* 1997; Marinho *et al.* 2005; de Lourdes Bastos *et al.* 2009), hanseníase (Tekle-Haimanot *et al.* 1991; Kashala *et al.* 1994), estrogiloidíase (Sato e Shiroma 1989; Porto *et al.* 2004; Porto *et al.* 2002), e escabiose severa (Takeshita e Takeshita 2000; Brites *et al.* 2002; Blas *et al.* 2005) em indivíduos infectados pelo HTLV-1, reforçam esta hipótese. Existem evidências que a dupla infecção HTLV-1 e HIV acelera a progressão da AIDS (Bartholomew *et al.* 1987; Page *et al.* 1990). Recentemente, demonstrou-se que os indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam, *in vitro*, uma diminuição da resposta aos antígenos de memória como tuberculina, candidina e ao toxóide tetânico (Mascarenhas *et al.* 2006).

1.2.4 Proliferação Celular Espontânea

O HTLV-1 tem tropismo para os linfócitos T, infectando preferencialmente linfócitos TCD4+CD45RO+ do sangue periférico (Popovic *et al.* 1983). Células TCD8+ também podem servir como reservatório para o vírus, que pode igualmente infectar outros tipos celulares como células da glia e células dendríticas, sendo que as células dendríticas podem apenas transferir o HTLV-1 para outra célula, mesmo sem estarem infectadas (Nagai *et al.* 2001; Hirayama *et al.* 1988; Hoffman *et al.* 1982; Jones *et al.* 2008). O HTLV-1 apresenta baixa taxa de replicação e pequena variabilidade genética.

In vivo, a infecção pelo HTLV-1 requer contato célula-célula, via a formação de uma sinapse virológica entre a célula infectada e a célula alvo.

Na sinapse virológica, uma célula infectada liga-se a uma célula alvo através de domínios de aderência periférica e um ou vários domínios de aderência central, formando agregados de ativação supramolecular (SMAC). Após esse contato, o vírus promove uma aderência prolongada e forte entre as células (Derse *et al.* 2001; Grakoui *et al.* 1999; Fan *et al.* 1992; Igakura *et al.* 2003).

A infecção ainda pode ocorrer quando a partícula viral se liga à superfície da célula, através da interação entre glicoproteínas do envelope viral e o receptor de superfície celular GLUT-1 (Manel *et al.* 2003). Com essa interação, o vírus torna-se capaz de penetrar na célula, liberando todo seu conteúdo no citoplasma. Uma vez no citoplasma a fita de RNA viral é transcrita a DNA de fita dupla pela enzima transcriptase reversa. A fita dupla de DNA migra para o núcleo e integra-se ao genoma do hospedeiro, pela ação da integrase viral, formando o DNA proviral. A partir daí, o provirus, utilizando-se da maquinaria celular, transcreve seu RNA genômico. Parte deste passa a ser sintetizado em RNA mensageiro que será traduzido em proteínas regulatórias. Logo então acontece a montagem do *core* viral. A propagação do vírus se dá por divisão mitótica, com a expansão clonal das células infectadas (Wattel *et al.* 1996). Essa expansão clonal resulta na proliferação de linfócitos TCD4+ e o acúmulo de células TCD8+, infectadas pelo vírus (Asquith *et al.* 2007; Zane *et al.* 2009).

A infecção pelo HTLV está associada à proliferação espontânea dos linfócitos T, *in vitro*. Collins e colaboradores em 1977 descobriram um fator de crescimento específico para linfócitos T maduros que permitiam que estes linfócitos fossem mantidos em cultura contínua, sendo mais tarde esse fator designado como IL-2. A proliferação espontânea é definida como a capacidade de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de proliferarem *ex vivo* na ausência de antígeno ou de suplementação de citocinas como IL-2 (Kramer *et al.* 1989). Essa é uma das alterações imunológicas mais importantes na infecção pelo HTLV-1, e utilizando-se métodos de avaliação da proliferação por incorporação de ³[H]-Timidina, pode ser observada em PBMC de cerca de 50% de indivíduos infectados (Prince *et al.* 1991). Linfócitos T CD4+ e CD8+ de memória (CD45RO) são as principais células envolvidas nesse fenômeno (Prince *et al.* 1995; Asquith *et al.* 2007). A proliferação *in vivo* foi descrita

por Asquith e colaboradores em 2007, utilizando marcação por deutério incorporado ao DNA das células em divisão. Através desta avaliação foi mostrada uma maior proliferação das células T CD4+CD45RO (células de memória) e uma associação entre a expressão da proteína viral TAX e o aumento da proliferação celular.

As células infectadas pelo HTLV-1 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. Estas alterações são mediadas primariamente pela ação transativadora da proteína TAX, que ativa um grande número de genes virais e do hospedeiro (Azran *et al.* 2004). TAX é uma fosfoproteína nuclear que vai e vem ao citoplasma através de um canal de exportação nuclear (Semmes *et al.* 1996). TAX modula a transcrição do genoma viral (LTR) e de diversos genes celulares do HTLV, incluindo as sequências para IL-2, IL-13, IL-15, IL-2R, fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF), fator de necrose tumoral (TNF-alfa), entre outros, além de protooncogenes como c-Fos e c-Jun (Sodroski 1992; Suzuki e Uchida-Toita 1999; Azran *et al.* 2004). Com sua ação transativadora, a proteína TAX associa-se às vias CREB/ATF, SRF e ao fator de transcrição NF- κ B, induzindo a transcrição do genoma viral (LTR) e de citocina como o da interleucina 2 (IL-2) e a cadeia alfa do seu receptor (IL-2R α). Além disso, a TAX pode estimular a mitose ativando as ciclinas D (CDK4 e CDK6), inibir proteínas regulatórias do ciclo celular (p15, p16, p53, pRb) e suprimir a apoptose pelo aumento de Bcl-2 (Suzuki e Uchida-Toita 1999; Azran *et al.* 2004), causando a proliferação espontânea dos linfócitos T. HBZ contribui para a transformação e proliferação celular, modulando a expressão de genes virais e do hospedeiro. HBZ suprime a expressão de Tax e a expressão de seu RNA mensageiro aumenta a expressão de genes incentivando assim a proliferação de células T (Mesnard, *et al.* 2006).

Os linfócitos T dos indivíduos infectados 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 *et al.* 1984; Romero *et al.* 2000). A intensidade da proliferação parece ser maior nos indivíduos com HAM/TSP (Itoyama *et al.* 1988). O aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF-alfa, IFN-gama e migração celular são observados em indivíduos infectados. Embora muitos

estudos encontrem uma maior frequência destes achados em indivíduos doentes, é possível observar tais alterações em muitos indivíduos assintomáticos (Carvalho *et al.* 2001; Mascarenhas *et al.* 2006). Tal estado de ativação pode igualmente induzir um grau de imunossupressão. Mesmo na ausência de proliferação linfocitária espontânea pode ser encontrada uma disfunção imune, mostrada pela redução significativa de resposta específica aos antígenos de memória (Mascarenhas *et al.* 2006).

Estudos recentes têm fornecido fortes indícios que células T regulatórias com seu desenvolvimento ou funções desreguladas têm sido um fator importante na patogênese de várias patologias que envolvem o sistema imune, como a HAM/TSP associada ao HTLV-1 (Grant *et al.* 2008). Células T regulatórias adaptativas são induzidas por antígenos, desenvolvem-se na periferia e exercem sua função através da secreção de citocinas inibitórias, como IL-10 e TGF- β . As células T regulatórias (CD4+CD25+) de indivíduos com HAM/TSP apresentam redução da função supressora, bem como da expressão de FoxP3 (Yamano *et al.* 2005). O FoxP3 foi identificado como um marcador molecular específico para células Treg e sua expressão é essencial para o desenvolvimento e a função dessa célula. Sabe-se que FoxP3 regula tanto a proliferação celular como a produção de citocinas e é expresso especificamente em células T regulatórias CD4+CD25+ (Grant *et al.* 2008).

1.2.5 Carga Proviral

A carga proviral é representada pela proporção de PBMCs que carregam um provírus integrado ao genoma. Essa carga proviral é que mantêm a infecção viral por meio da proliferação de linfócitos que carregam um provirus e expressam proteínas virais, particularmente TAX (Asquith *et al.* 2007). Poucos ciclos de replicação associados são suficientes para uma quantidade elevada de carga proviral (Wattel *et al.* 1996; Cavrois *et al.* 1996). Na maioria dos indivíduos infectados a carga proviral atinge um grau de estabilidade variando pouco ao longo do tempo (Asquith *et al.* 2005). Essa variação pode ser observada em caso de desenvolvimento de doença. A maioria dos indivíduos infectados permanece assintomáticos com a carga proviral estável. Entre os

pacientes com HAM/TSP, uma maior carga proviral tem sido relatada, comparada aos indivíduos assintomáticos (Vernant *et al.* 1987; Yoshida *et al.* 1989; Gessain *et al.* 1990; Olindo *et al.* 2005), o que tem sido considerado um fator de risco para o desenvolvimento de HAM/TSP (Nagai *et al.* 1998).

A resposta citolítica específica para o HTLV-1 desempenha um papel importante na determinação do equilíbrio entre a carga proviral e o controle da infecção. (Bangham e Osame 2005). O silenciamento viral, no qual as células infectadas não expressam proteínas virais, favorece a manutenção da carga proviral, quando ocorre escape da vigilância imune. Entretanto, células expressando vírus são essenciais para persistência viral, pois a expressão de TAX regula tanto a divisão de células infectadas como a expressão de genes envolvidos na proliferação (Yoshida 2005; Gatza *et al.* 2003; Nicot *et al.* 2001).

1.2.6 Tratamento

De modo contrário à infecção pelo HIV-1, cujos critérios para início do tratamento antiretroviral estão bem estabelecidos, não existem diretrizes que possam orientar o início de tratamento de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Grupos de indivíduos assintomáticos não são tratados – uma vez que se considera pequena a possibilidade de desenvolvimento de doença a partir da infecção. A indicação de terapêutica é restrita aos grupos sintomáticos – porém não existe um tratamento específico comprovadamente eficaz e poucas drogas estão disponíveis. Pacientes com doenças inflamatórias, especialmente, HAM/TSP, normalmente fazem uso de corticosteróides, como prednisona e IFN- α (Osame *et al.* 1990; Yamasaki *et al.* 1997). Pacientes que desenvolvem ATL que fazem uso de quimioterapia convencional como tratamento não apresentam boa resposta terapêutica (Taylor *et al.* 2001). Assim, justifica-se a necessidade de identificação de novas drogas, principalmente em países em desenvolvimento que apresentam esta infecção caracterizada como endêmica.

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

atividade anti-retroviral. São potentes inibidores da enzima integrase do HIV-1 (Mekour *et al.* 1998; Zouhiri *et al.* 2000) e foram capazes de inibir a proliferação de células infectadas pelo HTLV-1. Fakhfakh e colaboradores em 2003 demonstram a eficácia de um composto quinolínico contra a *Leshmania* e o HIV, sugerindo a utilização deste como terapia em casos de coinfeção *Leshmania*-HIV. Um composto quinolínico (fluoroquinolone K-37) foi capaz de inibir a replicação do HTLV-1 em células de linhagem MT-2 e MT-4, e em PBMC de dois indivíduos com HAM/TSP (Wang *et al.* 2002). Nossa equipe identificou compostos quinolínicos capazes de modular a intensidade de proliferação em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (Grassi, *et al.* 2008)

O desenvolvimento de métodos com maior sensibilidade para avaliar, *ex vivo*, a proliferação espontânea de linfócitos pode contribuir para a identificação de novas drogas, capazes de modular essa proliferação e ainda fornecer informações sobre componentes da resposta imune gerando perspectivas para estudos mais aprofundados, que possa então determinar a farmacocinética e estudos moleculares para determinar os mecanismos de ação.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar um método de avaliação da dinâmica da proliferação espontânea de linfócitos T de pacientes infectados pelo HTLV-1 utilizando o marcador *CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester* (CFSE), por citometria de fluxo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Quantificar os índices de proliferação celular de linfócitos T totais e das subpopulações linfocitárias T CD4+ e T CD8+;
2. Correlacionar proliferação celular com a carga proviral do HTLV-1;
3. Correlacionar proliferação celular com a expressão da proteína viral TAX.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho Experimental

Trata-se de um estudo experimental, de corte transversal, analítico, para padronizar um método de avaliação da dinâmica da proliferação espontânea em indivíduos infectados pelo HTLV-1 por citometria de fluxo.

3.2 Pacientes

Foram incluídos no estudo 30 pacientes infectados pelo HTLV-1 (16 assintomáticos e 14 HAM/TSP), provenientes no Centro de Referência de HTLV da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP), durante o período de junho à outubro de 2009. O diagnóstico de HAM/TSP ou de assintomático foi determinado pelo neurologista, segundo os critérios de De Castro-Costa (2006). Foram excluídos indivíduos em uso de drogas imunomoduladoras (corticoesteróides). Os controles não infectados (CTR) foram voluntários selecionados pertencentes a equipe da Fiocruz. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Fiocruz e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado pelos participantes do estudo.

3.3 Cultura Celular

Coletou-se 10 mL de sangue por punção venosa em tubos contendo heparina e 5 mL de sangue em tubos contendo EDTA. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram obtidas por gradiente de Ficoll. Para obtenção de linfoblastos, PBMC de doadores não infectados pelo HTLV-1 foram cultivados em presença de 2 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA) e suplementadas com 1 unidade/ml de IL-2 no terceiro dia. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, distribuindo-se 2×10^5 células por poço, durante cinco dias, em meio de cultura RPMI 1640 completo (suplementado com 2 mM glutamina - Sigma, 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina - Sigma, 100 µg/mL de HEPES- Invitrogen, 100 µg/mL de aminoácidos não essenciais -

GIBCO e 10% de Soro Fetal Bovino - SFB, Hyclone, Logan Utah) à 37° C com 5% de CO₂. No terceiro dia de cultura retirou-se 100 µL do meio presente e adicionou-se novamente 100 µL de meio de cultura completo.

3.4 Ensaio de Linfoproliferação

Para avaliar a proliferação de PBMC dos indivíduos infectados pelo HTLV-1, as células foram marcadas antes da cultura com *CarboxyFluorescein diacetate Succinimidyl Ester* (CFSE) - (Invitrogen, CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit C34554), de acordo com as instruções do fabricante. As células foram mantidas em cultura por diferentes tempos - 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Após a cultura, as células foram fixadas com solução de PBS/BSA 0,2% com Formaldeído 1% e adquiridas no citômetro de fluxo (BD FACSAria™, San Jose CA). Para avaliar a proliferação das subpopulações de linfócitos TCD4+ e TCD8+, foram adicionados anticorpos anti-CD3^{PE-Cy5} (BD Biosciences), anti-CD4^{PE} (Caltag) e anti-CD8^{APC} (BD Biosciences). As células foram fixadas em 300 µL de solução de PBS/BSA 0,2%/Formaldeído 1% por 20 min em temperatura ambiente ao abrigo da luz e mantidas à 4°C até à leitura no Citômetro de Fluxo (BD FACSAria™, San Jose CA), 10⁵ eventos por aquisição. Os resultados foram analisados pelo software FlowJo (versão 7.5, Tree Star, Inc. 1997 - 2009).

O programa FlowJo fornece os índices utilizados para avaliação da proliferação espontânea das células marcadas com CFSE, sendo porcentagem de células divididas e índice de divisão celular os índices utilizados neste estudo. A porcentagem de células divididas é a porcentagem de células da amostra original que dividiram, assumindo que nenhuma célula morreu durante a cultura. O índice de divisão celular é a média do número de divisões celulares que as células sofreram, ignorando as células que permanecem na geração zero, ou seja, não dividiram.

A carboxifluoresceína diacetate succinimidyl ester (CFSE) é um reagente incolor não fluorescente, que possui grupos acetatos que ao serem clivados intracelularmente formam grupos éster altamente fluorescentes. O grupo succinimidyl ester reage com as aminas intracelulares, formando conjugados fluorescentes que são bem conservados. O

excesso de reagentes não conjugados e subprodutos são difundidos de forma passiva para o meio extracelular, onde podem ser lavados. A fluorescência que se forma nas células marcadas são mantidas durante o desenvolvimento celular e meiose e podem ser usados para detecção. A marcação é herdada pelas células-filhas após uma divisão celular e não é transferida para células adjacentes em uma população.

O programa utilizado para analisar a intensidade de fluorescência, FlowJo, utiliza-se da intensidade de fluorescência emitida por cada célula e então são calculadas as medidas de proliferação.

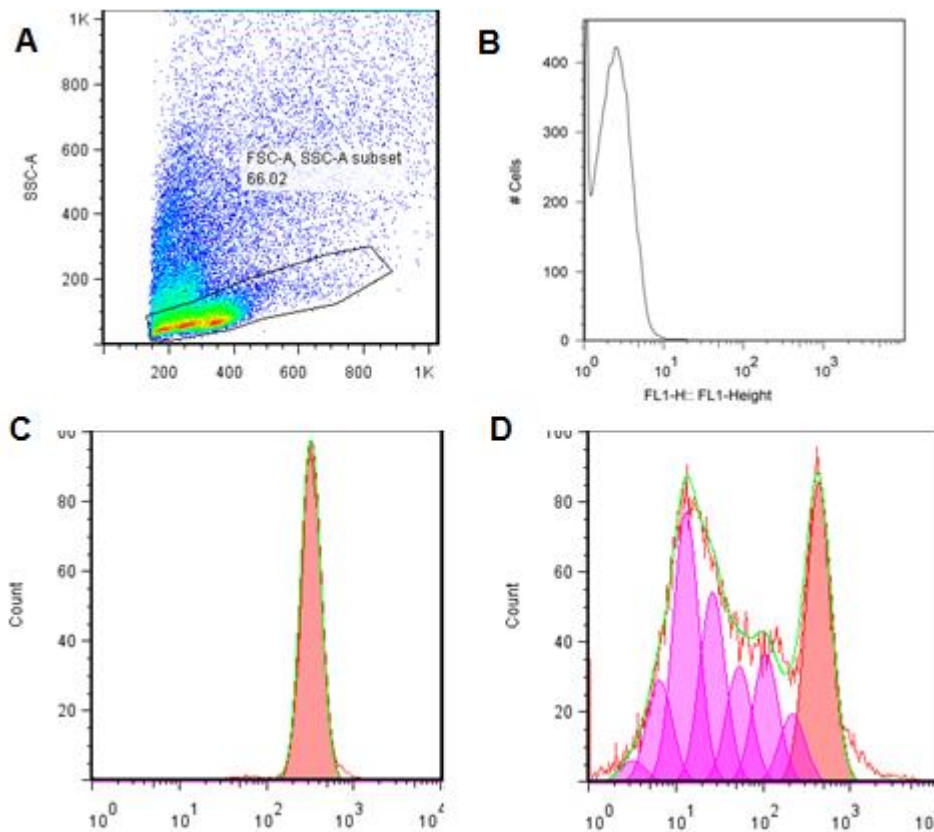


Figura I: Perfil das amostras marcadas com CFSE e analisadas pelo programa FlowJo. **A** - População de linfócitos selecionados para análise. **B** – Células não marcadas. **C** – Pico ou geração zero representando células que não proliferaram. **D** – Controle estimulado com fitohemaglutinina (PHA), geração zero e oito gerações de células. Cada geração representa uma divisão celular.

3.5 Quantificação da Expressão de TAX

A porcentagem de células infectadas pelo HTLV-1 que expressam a proteína TAX foi avaliada após 18 horas de cultura (Asquith *et al.* 2007), através de detecção intracelular com anticorpo monoclonal Lt-4^{FITC} e controle isotípico IgG₃^{FITC} (cedido pelo professor Yuetsu Tanaka, *Sch. of Med. Dept. of Immunology – Nishirara - Japan*). As células foram marcadas com anti-CD3^{PE-Cy5} (BD Biosciences), CD4^{PE} (Caltag) e logo após fixação foram lavadas com 2 ml de PBS-BSA 0,2%-Saponina 0,2% e por 5 min à 1500 rpm. Para permeabilização das células, acrescentou-se 2 mL da solução de PBS/BSA 0,2%/Saponina 0,2% durante 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Centrifugou-se por 5 minutos a 1500 rpm. Após a lavagem, foram acrescentados 5 µL de Soro AB e incubou-se por 15 min a 4°C. Logo após, adicionou-se o anticorpo monoclonal Lt-4^{FITC} ou o controle isotípico IgG₃^{FITC} por 30 min à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Foram feitas duas lavagens com 2 ml de PBS-BSA 0,2%, centrifugando por 5 min à 1500 rpm. O *pellet* foi ressuscitado em 300 µL de solução de PBS/BSA 0,2%/Formaldeído 1% por 20 min à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. As células foram mantidas à 4°C até à leitura no Citômetro de Fluxo (BD FACSAriaTM, San Jose CA), 10⁵ eventos por aquisição.

3.6 Quantificação da Carga Proviral do HTLV-1

Extraíu-se DNA de 1x10⁶ PBMC obtido do tubo contendo EDTA com QIAAMP DNA MINI KIT, seguindo as instruções do fabricante. A carga proviral foi mensurada utilizando PCR em tempo real através do sistema TaqManTM da Applied Biosystems do Brasil, como descrito por Dehee *et al.* 2002. Foram utilizados os primers SK110/SK111 para o fragmento de pol e sonda TaqMan (5'FAM and 3' TAMRA) para a seqüência referência do HTLV-1 (HTLVATK), localizado no fragmento 4829-4858 pb. Como controle interno foi utilizado a quantificação do DNA da albumina. A quantidade de provírus foi calculada através da razão entre o número de cópias do gene pol HTLV-1 e o número de cópias de albumina, obedecendo à seguinte fórmula: CPV= número de cópias do HTLV-1 (gene pol)x10⁶ / número de cópias da albumina/2.

3.7 Análise Estatística

As variáveis foram descritas como porcentagens, médias, medianas e desvio padrão. O teste não paramétrico utilizado para amostras independentes foi Mann-Whitney. As correlações foram avaliadas através da correlação de Spearman. As diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0.05$. O programa Grafpad Prism Versão 5.0 foi utilizado para as análises.

4. RESULTADOS

4.1 Características Gerais dos Pacientes

Dos 30 pacientes infectados pelo HTLV-1 avaliados, 16 eram assintomáticos e 14 tinham diagnóstico de HAM/TSP (**Tabela 01**). A média de idade dos pacientes com HAM/TSP ($51,1 \pm 10,5$ anos) foi superior a dos indivíduos assintomáticos ($41,1 \pm 12,3$ anos) ($p=0,03$), assim como a carga proviral. Em média, a carga proviral dos pacientes com HAM/TSP foi duas vezes superior a dos assintomáticos, porém essa diferença não foi significativa ($p=0,05$).

Tabela 01: Características gerais dos indivíduos infectados com HTLV-1

Características dos Pacientes	HAM/TSP n=14	Assintomáticos n=16
Idade*		
média \pm SD ¹	51,1 \pm 10,5	41,1 \pm 12,3
mediana	49,5	41
Sexo (n)		
feminino	9	12
masculino	5	4
CPV ² em $1 \cdot 10^6$ PBMC**		
média \pm SD ¹	35.171 \pm 33.741	18.038 \pm 26.175
mediana	21.145	6399

¹SD= Desvio Padrão ²CPV= Carga Proviral * $p < 0,03$ ** $p = 0,05$ (Mann Whitney)

4.2 Análise da Proliferação Espontânea dos Linfócitos T

Foram avaliados dois índices de proliferação: a porcentagem de células divididas e o índice de divisão celular. O ponto de corte, determinado a partir do cultivo de células de controles não infectados pelo HTLV-1 com doses basais de IL-2 foi de 5% para porcentagem de células divididas e índice de divisão celular foi estabelecido em 0,06. Quanto à cinética de proliferação celular, avaliando-se as culturas de quatro indivíduos infectados pelo HTLV-1, observa-se que as células mononucleares de dois proliferaram (CHTLV 4837 e CHTLV 5955, ambos com diagnóstico de HAM/TSP) enquanto as células dos outros dois indivíduos, que eram assintomáticos, não proliferaram (**Figura 5**). A proliferação espontânea pode ser detectada nas primeiras 24 horas de cultura.

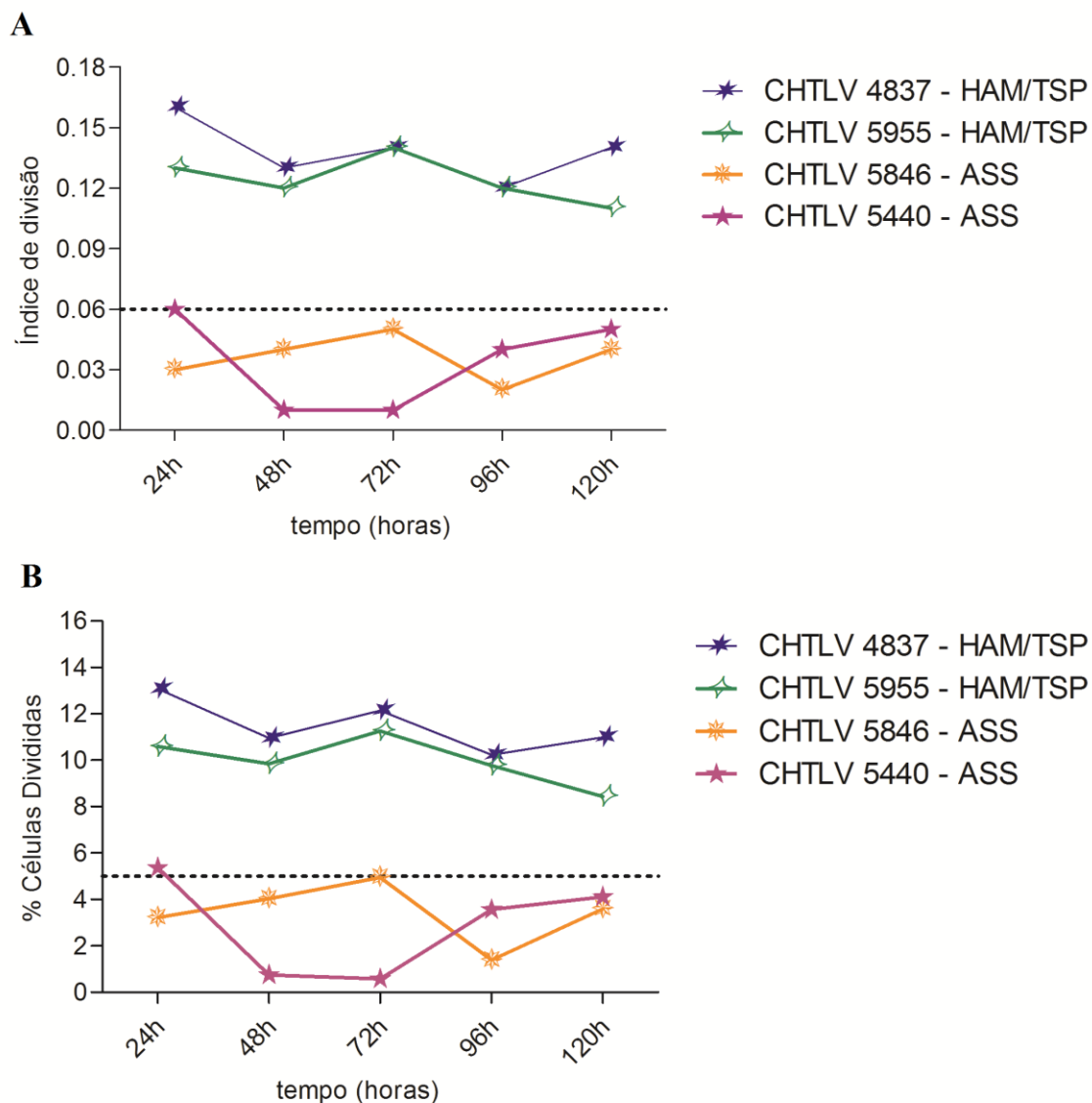


Figura 05: Cinética da proliferação espontânea de linfócitos T em indivíduos infectados pelo HTLV assintomáticos e com HAM/TSP determinado por citometria de fluxo. As células foram cultivadas em presença de CFSE e os eventos foram analisados pelo programa FlowJo®. **A** - Índice de divisão de celular. **B** - Porcentagem de células divididas. A linha pontilhada indica o ponto de corte para cada um dos parâmetros avaliados.

A proporção de indivíduos apresentando proliferação espontânea de PBMC foi superior no grupo de pacientes com HAM/TSP (porcentagem de células divididas: 79%, índice de divisão celular: 79%), comparada aos assintomáticos (porcentagem de células divididas: 50%, índice de divisão celular: 56,3%), porém essa diferença não foi significativa (**Tabela 2**).

Tabela 02: Número e proporção de indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e com HAM/TSP que apresentam proliferação espontânea segundo os índices determinados com CFSE e analisados pelo programa FlowJo® .

	Total n = 30 (%)	ASS n = 16 (%)	HAM/TSP n = 14 (%)
Índice de Divisão*	20 (66,7)	09 (56,3)	11 (79)
% Células Divididas**	19 (63,3)	08 (50)	11 (79)

ASS x HAM/TSP: *p=0,1 **p=0,1 (Teste Exato de Fisher)

A porcentagem média de células divididas nos indivíduos assintomáticos ($8,1 \pm 9,0$) foi semelhante a dos pacientes com HAM/TSP ($9,8 \pm 7,6$), $p=0,4$ (**Figura 06-B**). O mesmo foi observado para o índice de divisão celular: a média nos indivíduos assintomáticos ($0,1 \pm 0,1$) foi semelhante à média obtida nos pacientes com HAM/TSP ($0,12 \pm 0,08$) (**Figura 06-A**).

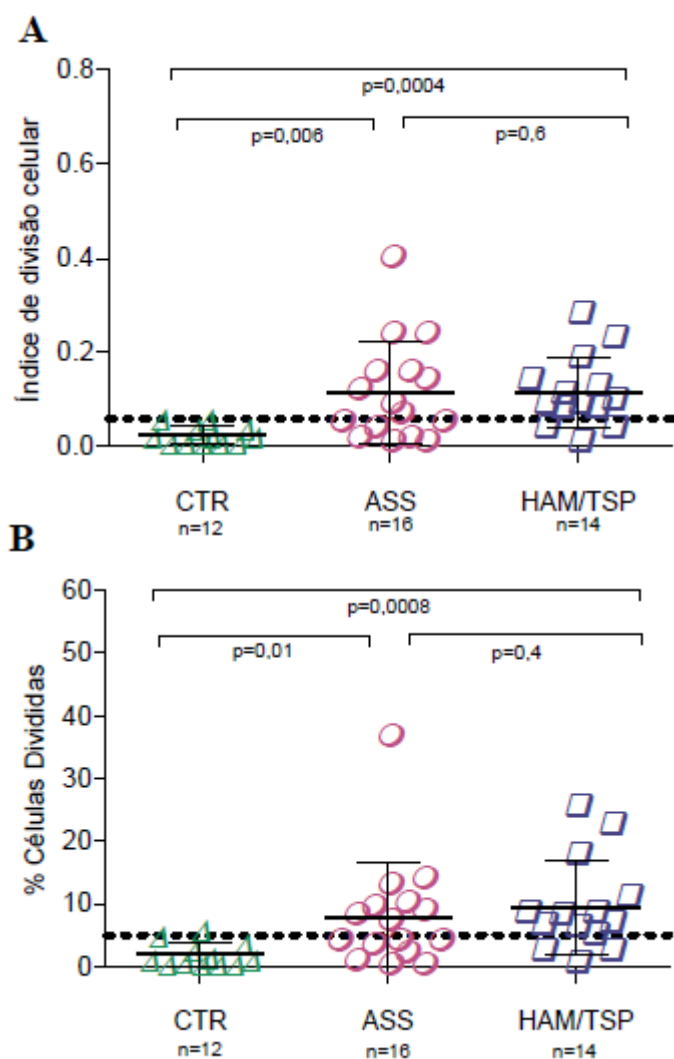


Figura 06: Avaliação da proliferação espontânea de linfócitos T em indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e com HAM/TSP determinado por citometria de fluxo. As células foram cultivadas em presença de CFSE e os eventos foram analisados pelo programa FlowJo®. **A** - Índice de divisão de celular. **B** - Porcentagem de células divididas. A linha pontilhada indica o ponto de corte para cada um dos parâmetros avaliados. Os grupos foram comparados dois a dois utilizando o teste Mann Whitney. Para os controles não infectados, a média de porcentagem de células divididas foi 2% e índice de divisão celular 0,03, na presença de IL-2 (1UI/ml) e porcentagem de células divididas de 27% e índice de divisão celular de 0,63 na presença de fitohemaglutinina (2 µg/ml).

4.3 Análise da Proliferação Espontânea das Subpopulações Linfocitárias T CD4+ e T e CD8+

O ponto de corte, determinado a partir do cultivo de células de controles não infectados pelo HTLV-1 com doses basais de IL-2, foi de 4,8 para porcentagem de linfócitos T CD4+ divididos e de 6,9 para a porcentagem de linfócitos T CD8+ divididos. Para os índices de divisão celular, o ponto de corte foi de 0,05 para linfócitos TCD4+ e de 0,09 para os linfócitos T CD8+.

As médias de linfócitos TCD4+ que dividiram em pacientes com HAM/TSP ($8,4 \pm 7,7$) são discretamente superior à media do grupo de indivíduos assintomáticos ($4,4 \pm 4,4$) $p=0,1$ (**Figura 07-C**); entretanto esta diferença não é estatisticamente significante. O mesmo foi observado para o índice de divisão celular nos indivíduos assintomáticos ($0,05 \pm 0,05$) e pacientes com HAM/TSP ($0,10 \pm 0,08$), $p=0,1$ (**Figura 07-A**). Para os linfócitos TCD8+ a proporção de linfócitos que dividiram em indivíduos assintomáticos ($6,5 \pm 5,5$) foi semelhante à do grupo de pacientes com HAM/TSP ($6,6 \pm 6,4$), $p=0,1$ (**Figura 07-D**). O mesmo foi observado para o índice de divisão celular nos indivíduos assintomáticos ($0,2 \pm 0,3$) e pacientes com HAM/TSP ($0,1 \pm 0,1$), $p=0,1$ (**Figura 07-B**).

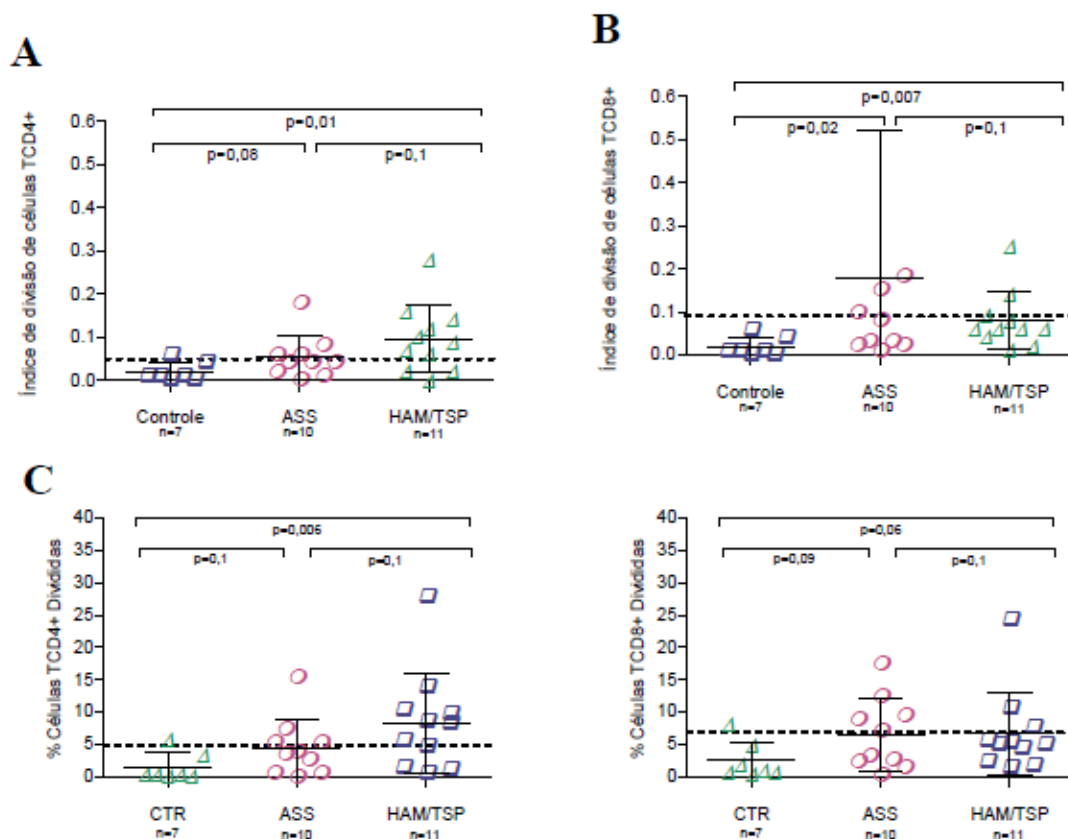


Figura 07: Avaliação da proliferação espontânea de linfócitos TCD4+ e TCD8+ em indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e com HAM/TSP determinado por citometria de fluxo. As células foram cultivadas em presença de CFSE e os eventos foram analisados pelo programa FlowJo®. **A** - Índice de divisão de celular de linfócitos T CD4+. **B** - Índice de divisão de celular de linfócitos T CD8+. **C** - Porcentagem de células T CD4+ divididas. **D** - Porcentagem de células T CD8+ divididas. Os grupos foram comparados dois a dois utilizando o teste não-paramétrico Mann Whitney. Para os controles não infectados, a média de porcentagem de células TCD4+ divididas foi 1,5% e índice de divisão celular 0,02, na presença de Il-2 (1UI/ml) e porcentagem de células divididas de 21% e índice de divisão celular de 0,3 na presença fitohemaglutinina (2 µg/ml). Para a subpopulação T CD8+, a média de porcentagem de células divididas foi 2,5% e índice de divisão celular 0,03, na presença de Il-2 (1UI/ml) e porcentagem de células divididas de 49% e índice de divisão celular de 1,0 na presença fitohemaglutinina (2 µg/ml).

4.4 Correlação entre Proliferação Celular e a Carga Proviral do HTLV-1

Não houve correlação entre a carga proviral e a porcentagem de células divididas (**Figura 08 - A**) ($r = -0,009$; $p = 0,9$) e índice de divisão celular ($r = 0,1$; $p = 0,5$) (**Figura 08 - B**).

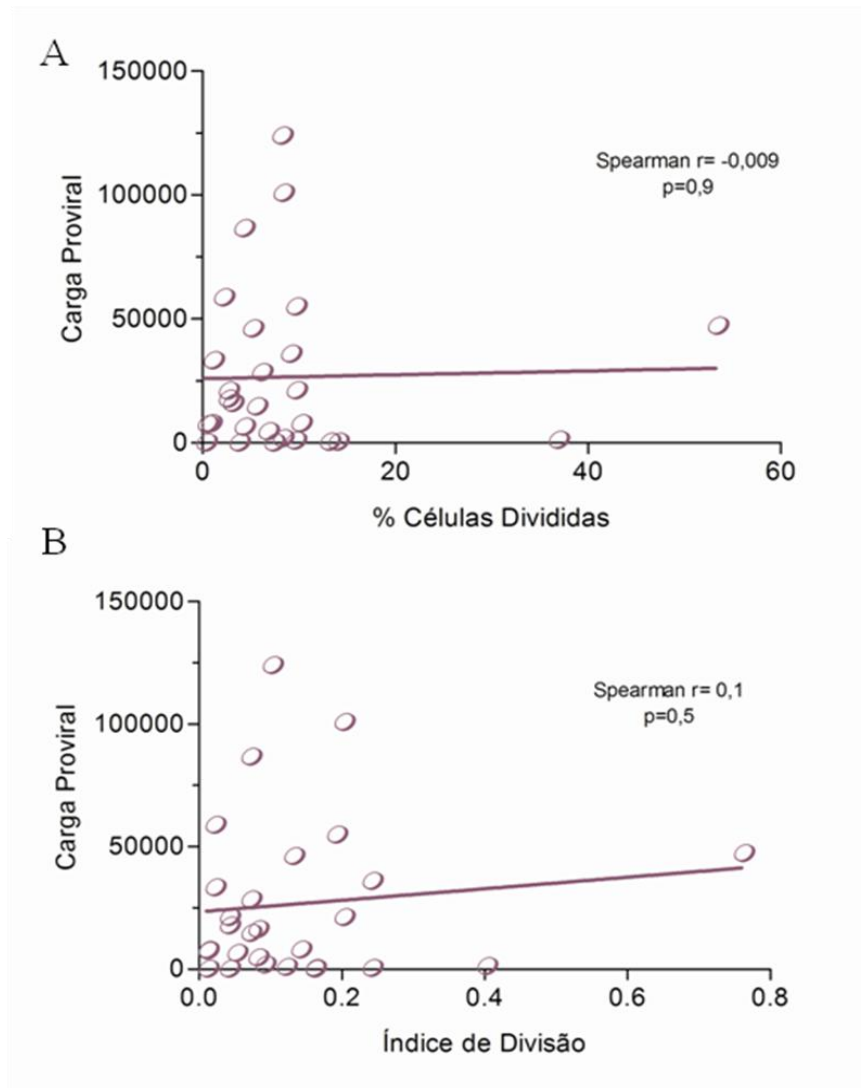


Figura 08: Correlação entre proliferação celular e carga proviral de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (n=28). **A** – Correlação da porcentagem de células divididas e carga proviral. **B** – Correlação do índice de divisão celular e carga proviral. Para a análise foi utilizada a correlação de Spearman.

4.5 Correlação da Proliferação Celular com a Expressão da Proteína TAX

A expressão de TAX foi avaliada em 11 indivíduos infectados (7 assintomáticos e 4 com HAM/TSP) (**Figura 09 e Tabela 3**). A expressão foi detectada em 9 dos 11 indivíduos avaliados (81,8%). A média de expressão de TAX em linfócitos TCD4+ foi de $2,4 \pm 2,4$ %.

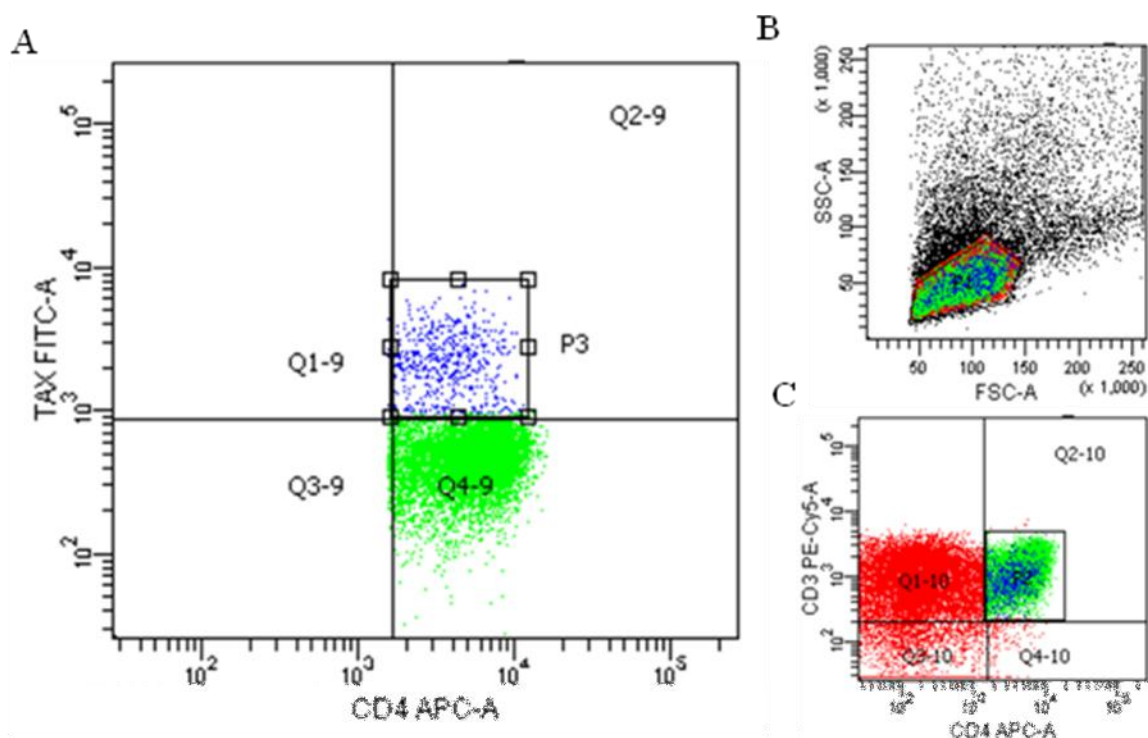


Figura 09: Avaliação da expressão da proteína intracelular TAX em linfócitos T CD4+ de indivíduo infectado com HTLV-1. As células foram marcadas com anti-CD3^{PECy5}, anti-CD4^{PE} e Lt-4^{FITC} ou IgG₃^{FITC} e adquiridas no Citômetro de Fluxo (BD FACSariaTM, San Jose CA). **A** - Expressão de TAX. **B** - População de PBMC total selecionado para análise. **C** - População de linfócitos TCD3+CD4+ selecionada do PBMC.

Tabela 03: Proporção de linfócitos T CD4+ produtores de TAX em indivíduos infectados pelo HTLV-1

Indivíduos	Sintomatologia	% TAX	CPV
CHTLV 2673	ASS	1,1	Indetectável
CHTLV 0943	ASS	4,5	7865
CHTLV - P28	ASS	5,9	58655
CHTLV 5440	ASS	1,6	6399
CHTLV 5846	ASS	0	53
CHTLV 5722	ASS	0	14
CHTLV 5951	ASS	0,3	33204
CHTLV 5862	HAM/TSP	0,4	21115
CHTLV 4837	HAM/TSP	4,7	ND
CHTLV 5955	HAM/TSP	5,9	ND
CHTLV 5965	HAM/TSP	1,7	ND

Para a porcentagem total de linfócitos T CD4+ produtores da proteína TAX, PBMC de oito indivíduos foram cultivados por 18 horas na estufa à 37° C com 5% de CO₂. Detecção intracelular avaliada por citometria de fluxo. Média: 2,4 ± 2,4 ¹CPV: Carga Proviral. ND: Não disponível.

Houve correlação entre a expressão da proteína TAX e a porcentagem de células divididas ($r=0,59$; $p=0,05$) e o índice de divisão celular ($r=0,60$; $p=0,05$) na amostra avaliada (**Figura 10**), porém sem significância estatística.

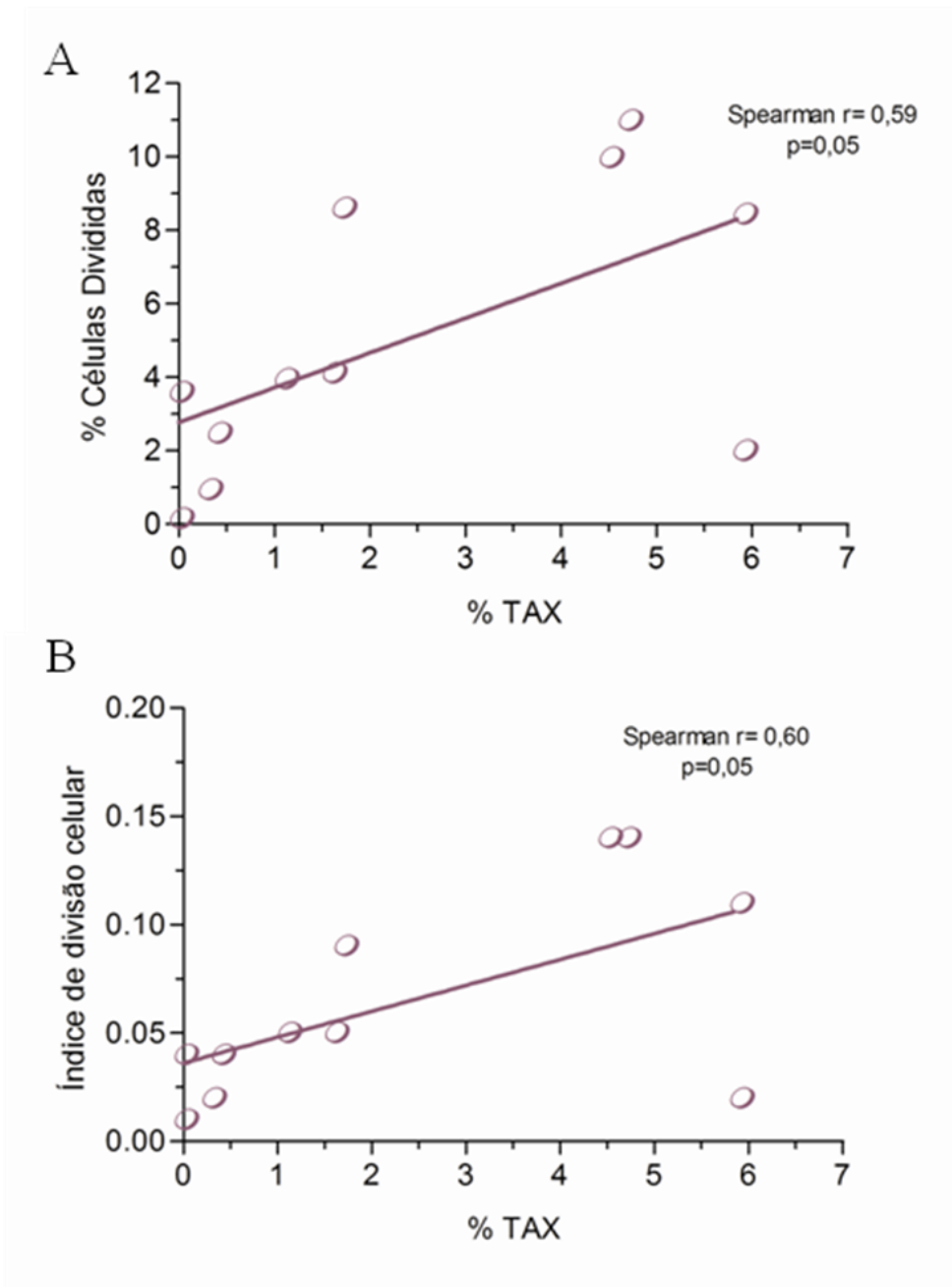


Figura 10: Correlação entre proliferação celular e expressão intracelular de TAX em linfócitos TCD4⁺ de indivíduos infectados com HTLV-1 (n=8). **A** – Correlação entre porcentagem de células divididas e expressão de TAX. **B** – Correlação do índice de divisão celular e expressão de TAX. Para a análise foi utilizada a correlação de Spearman.

No entanto, encontrou-se uma correlação positiva entre a porcentagem de células T CD4+ divididas e a expressão da proteína TAX ($r=0,79$; $p<0,003$), bem como entre o índice de divisão das células TCD4+ e a expressão da proteína TAX ($r=0,75$; $p=0,008$) (**Figura 11**).

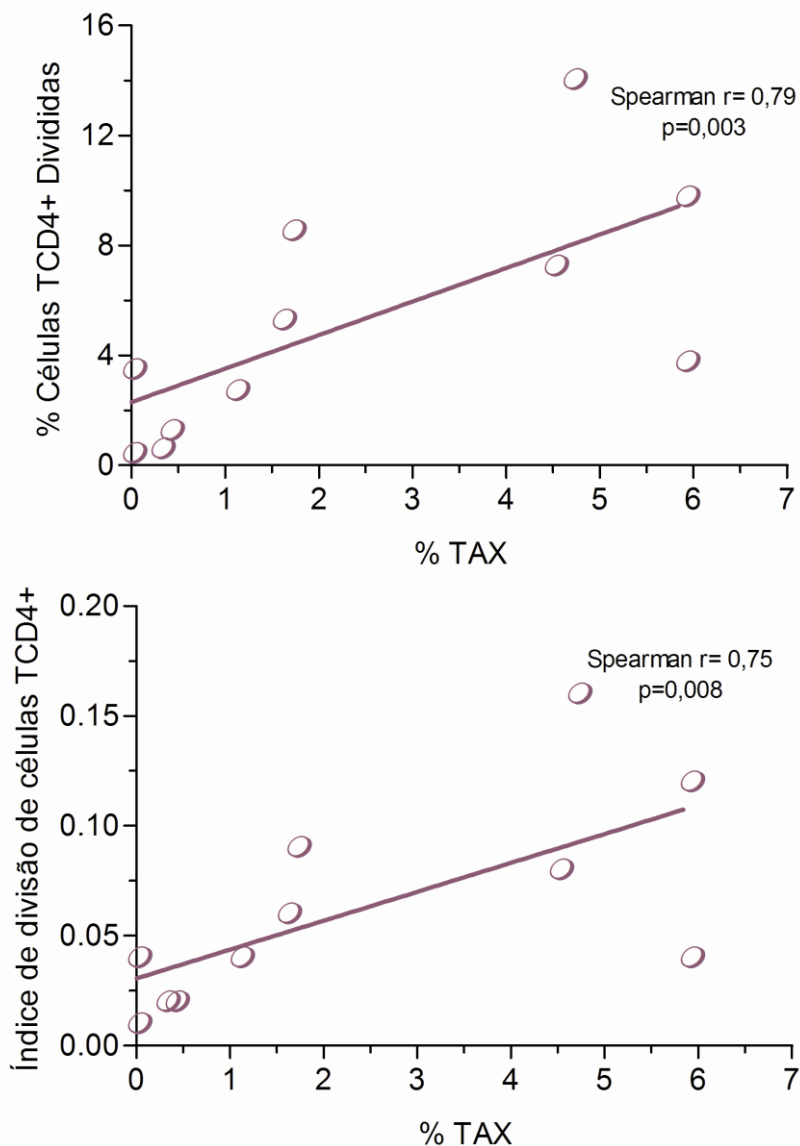


Figura 11: Correlação entre proliferação de linfócitos TCD4+ e expressão intracelular de TAX em linfócitos TCD4+ de indivíduos infectados com HTLV-1 (n=11). **A** – Correlação entre porcentagem de células TCD4+ divididas e expressão de TAX. **B** – Correlação do índice de divisão de células TCD4+ e expressão de TAX. Para a análise foi utilizada a correlação de Spearman.

Não houve correlação entre a porcentagem de células T CD8+ divididas e a expressão da proteína TAX ($r=0,26$; $p<0,4$) e entre o índice de divisão das células TCD8+ e a expressão da proteína TAX ($r=0,13$; $p=0,7$) (**Figura 12**).

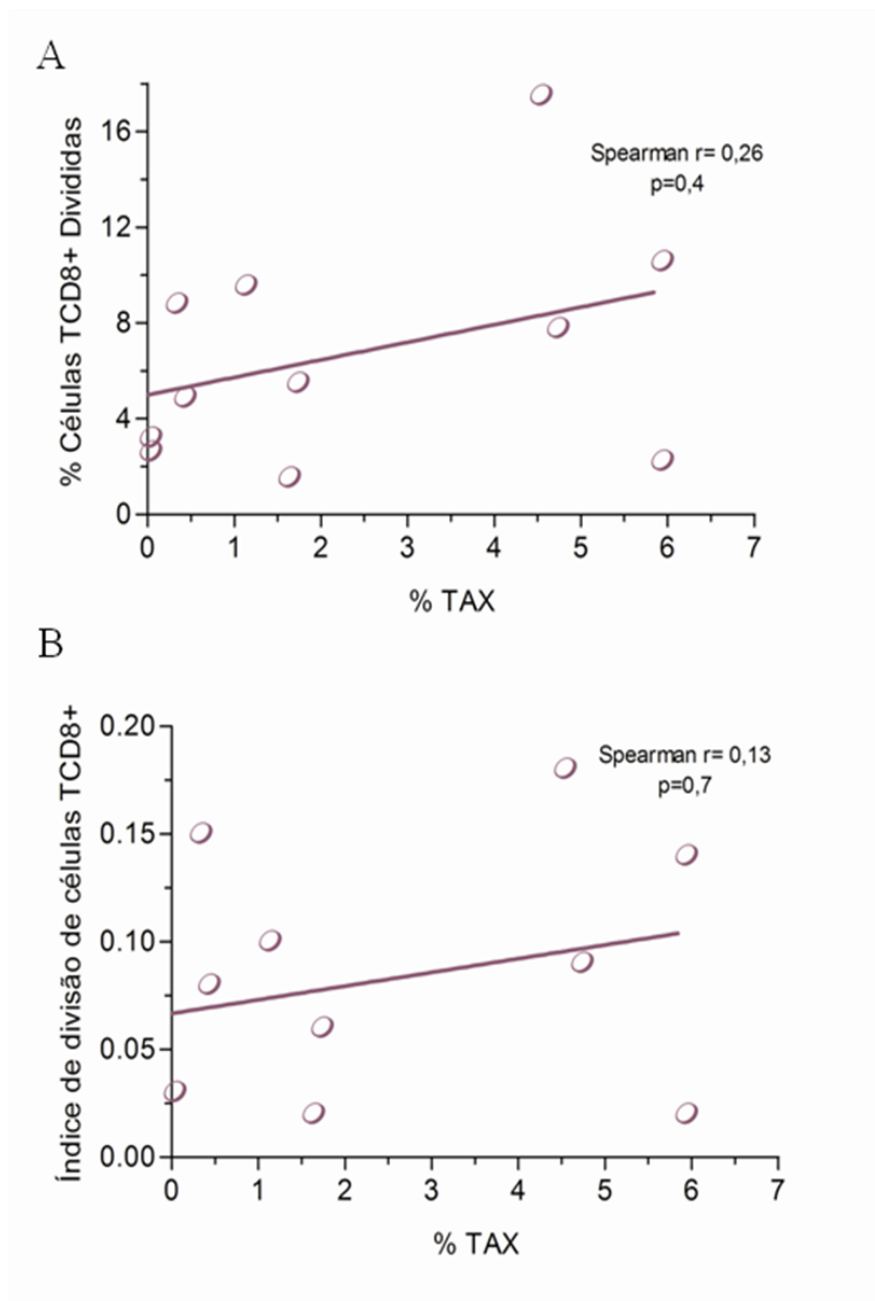


Figura 12: Correlação entre proliferação de linfócitos TCD8+ e expressão intracelular de TAX em linfócitos TCD4+ de indivíduos infectados com HTLV-1 (n=11). **A** – Correlação entre porcentagem de células TCD8+ divididas e expressão de TAX. **B** – Correlação do índice de divisão de células TCD8+ e expressão de TAX. Para a análise foi utilizada a correlação de Spearman.

Foi observada uma tendência entre a maior expressão da proteína TAX e a carga proviral elevada em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 ($r=0.67$, $p = 0,1$) (**Figura 13**).

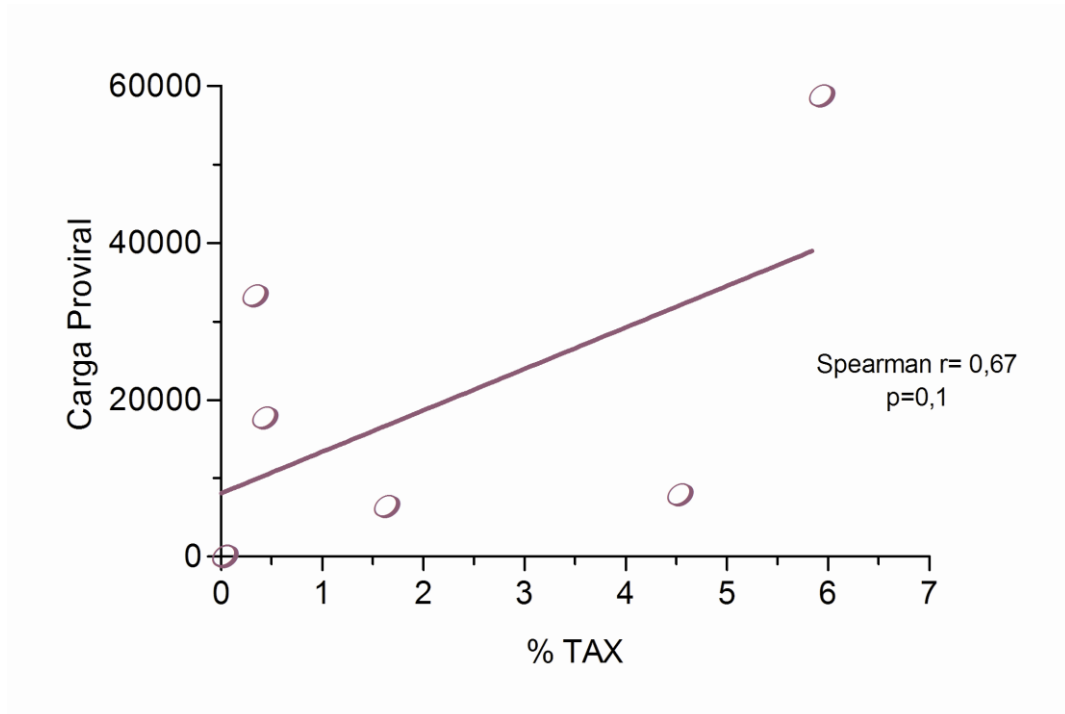


Figura 13: Correlação da expressão da proteína intracelular TAX em linfócitos TCD4+ e a carga proviral de indivíduos infectados com HTLV-1 ($n=8$). Para a análise foi utilizada a correlação de Spearman.

5. DISCUSSÃO

A proliferação espontânea é referida como uma das alterações imunológicas mais característica da infecção pelo HTLV-1, mas sua conseqüência na patogênese ainda não está esclarecida (Prince *et al.* 1991; Lunardi-Iskandar e Gessain 1993). Neste estudo piloto, utilizamos pela primeira vez o marcador CFSE para analisar os resultados através do *software* FlowJo, nas culturas de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 para avaliar a proliferação através de diferentes índices. Dentre os diferentes dados fornecidos pela *software*, encontramos a visualização das gerações celulares e das subpopulações envolvidas na proliferação. É possível também quantificar essa proliferação e a proporção de células que proliferam em diferentes momentos (Breslin *et al.* 2005). Comparado à incorporação de ³H-timidina, classicamente utilizado no contexto da infecção pelo HTLV-1 (Prince *et al.* 1991), o ensaio com CFSE fornece um maior número de índices para análises estatísticas, informações sobre os fenótipos das células, é menos trabalhoso, não é tóxico, tem menor custo e maior segurança, pois não envolve substâncias radioativas (Wells *et al.* 1997; Hasbold *et al.* 1999; Givan *et al.* 1999; Gett e Hodgkin 2000; Liu *et al.* 2006). Os parâmetros avaliados pelo programa FlowJo foram a porcentagem de células divididas, porcentagem de células da amostra original que dividiu, assumindo que nenhuma célula morreu durante a cultura e o índice de divisão celular, média do número de divisões celulares que as células sofreram, ignorando as células que permanecem na geração zero, ou seja, não dividiram. Ângulo e Fulcher em 1998 sugerem que o índice de divisão comparado a porcentagem de células divididas obtidos após marcação com CFSE determina com mais precisão o número de divisões celulares que ocorrem durante a cultura.

Quando avaliamos a proliferação espontânea de linfócitos T, *ex vivo*, constatamos que essa proliferação pôde ser quantificada desde as primeiras 24 horas de cultura celular. O pico de proliferação celular de PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 avaliados pela incorporação de ³H-timidina ocorre entre o 3º e 4º dia de cultura (dados não publicados). A proliferação espontânea, avaliada pelos índices de divisão de células e porcentagem de células divididas foi evidenciada em 66,7% do total de indivíduos envolvidos no estudo. Nossos resultados são semelhantes ao de outros estudos que utilizaram o método de avaliação por incorporação de ³H-timidina, nos quais a proliferação espontânea pôde ser observada em PBMC de cerca de 50% a 69% de indivíduos infectados com HTLV-1 (Prince *et al.* 1991; Mascarenhas, 2006).

Considerando equivalência encontrada pela incorporação de ^3H -timidina em avaliar a proliferação e as diversas vantagens já apresentadas pela marcação com CFSE, sugerimos que a aplicação da técnica aqui utilizada tem várias vantagens sobre o ensaio tradicional de incorporação de ^3H -timidina.

As principais células envolvidas na proliferação espontânea são os linfócitos T CD4+ e CD8+ de memória (CD45RO) (Prince *et al.* 1995; Asquith *et al.* 2007). Conseguimos observar proliferação tanto na população de linfócitos T CD4+, como na população de T CD8+ de indivíduos assintomáticos e pacientes com HAM/TSP. Embora sem significância estatística encontramos um discreto aumento de proliferação nos pacientes com HAM/TSP, concordando dessa forma com os estudos que sugerem que a proliferação espontânea seja maior nestes pacientes (Santos *et al.* 2004; Itoyama *et al.* 1988). Além disso, encontramos proliferação espontânea em linfócitos T CD4+ e T CD8+ aumentadas nos indivíduos infectados do que nos controles não infectados, sendo dessa forma consistente com a ativação imune persistente em indivíduos infectados (Asquith *et al.* 2007). Essa população de linfócitos T CD8+ em intensa proliferação pode estar inibindo a persistência do vírus, promovendo um impacto sobre a carga proviral, controlando-a nos indivíduos infectados.

Adicionalmente, encontramos uma correlação positiva entre a expressão da proteína TAX em linfócitos T CD4+, *ex vivo*, e a intensidade de proliferação de linfócitos T CD4+. Essa correlação direta pode justificar a expansão linfocitária influenciada, especialmente pela ação transativadora de TAX, que induz proliferação (Richardson *et al.* 1990; Hollsberg 1999; Azran *et al.* 2004; Asquith *et al.* 2007), e uma imortalização e transformação de células, levando ao desenvolvimento de doenças associadas (Yoshida 2005). Sabendo que a expressão de TAX está relacionada com o início da transcrição viral precoce, possivelmente a expressão de TAX é um indicativo de expressão de outras proteínas virais aumentado assim à possibilidade de uma maior proliferação de células infectadas, como os linfócitos T CD4+.

A carga proviral - representada pela proporção de PBMCs que carregam um provírus integrado ao genoma - tem sido considerada um importante fator de risco para desenvolvimento de doença. Alguns estudos indicam que a carga proviral é proporcionalmente inferior nos indivíduos assintomáticos, quando comparados com indivíduos com HAM/TSP ou ATLL (Olindo *et al.* 2005; Matsuzaki *et al.* 2001; Nagail *et al.* 1998). A carga proviral é considerada baixa quando menos de 1% do PBMC carregam o provirus, intermediária quando de 1% a 5% do PBMC está infectado e alta

quando mais que 5% do PBMC está infectado pelo vírus (Gonçalves *et al.* 2008). Na infecção pelo HTLV-1 o risco de HAM/TSP aumenta quando a carga proviral ultrapassa 1% no PBMC (Nagai *et al.* 1998). Em nosso estudo, a carga proviral dos pacientes com HAM/TSP foi cerca de duas vezes superior aos dos assintomáticos, no entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa. Isso pode ser justificado não apenas pelo pequeno tamanho da amostra estudada, mas igualmente por características clínicas dos pacientes com HAM/TSP, limitada aos indivíduos que não faziam uso de drogas imunomoduladoras (corticóide) e estavam em uma fase inicial da doença. De acordo com os critérios de De Castro-Costa (2006), 60% dos pacientes possuíam diagnóstico de HAM/TSP possível ou provável.

Não foi possível estabelecer uma correlação entre a proliferação espontânea e a carga proviral dos indivíduos estudados. Contudo, encontrou-se uma tendência entre a expressão da proteína TAX e a carga proviral em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Essa relação direta entre TAX e a carga proviral apesar de não ser estatisticamente significativa, reforça a probabilidade da expressão de TAX por células infectadas ser correlacionada com alta carga proviral (Asquith *et al.* 2005).

A aplicação desta metodologia poderá nos ajudar a entender de forma mais refinada a determinar como e em que tempo drogas podem estar agindo na modulação dessa proliferação espontânea de linfócitos T infectados pelo HTLV-1. Sendo nosso trabalho um estudo piloto, para posterior avaliação da modulação da proliferação espontânea empregando drogas como por exemplo, derivados de quinolinas, acreditamos que o emprego dessa técnica e a análise pelo *software* FlowJo será de grande importância.

6. CONCLUSÕES

A aplicação da técnica utilizando o marcador CFSE para avaliação da dinâmica da proliferação espontânea de linfócitos T por citometria de fluxo em indivíduos infectados com HTLV-1 é exequível. Observou-se proliferação em 66,7% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Foi possível quantificar a proliferação espontânea tanto nos linfócitos T totais como nas subpopulações de linfócitos TCD4+ e TCD8+.

Não foi encontrada correlação entre carga proviral e a proliferação espontânea dos indivíduos infectados.

Observou-se uma correlação direta entre a expressão da proteína TAX e a proliferação de linfócitos T CD4+.

7. PERSPECTIVAS:

- Aumentar o número de indivíduos estudados;
- Correlacionar os índices de proliferação avaliados pelo software FlowJo e a intensidade de proliferação avaliada pela incorporação de timidina;
- Quantificar a proliferação espontânea nas subpopulações de linfócitos T CD4+ Tax+ e Tax-
- Utilizar o método padronizado para identificar os possíveis mecanismos de ação dos compostos quinolínicos sintéticos sobre a modulação da proliferação celular em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1, cultivados na presença e na ausência dos compostos quinolínicos.

8. BIBLIOGRAFIA

ANGULO, R.; FULCHER, D.A. *et al.* Measurement of *Candida*-Specific Blastogenesis: Comparison of Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester Labelling of T Cells, Thymidine Incorporation, and CD69 Expression **Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)** v.34, p.143–151. 1998

ASQUITH, B.; *et al.* A functional CD8+ cell assay reveals individual variation in CD8+ cell antiviral efficacy and explains differences in human Tlymphotropic virus type 1 proviral load. **J Gen Virol**, v.86 p.1515-1523. 2005

ASQUITH, B.; *et al.* In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.104, n.19, p.8035-8040. 2007.

AZRAN, I., *et al.* Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. **Retrovirology** v.1, n.1, p. 20. 2004.

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

BARTHOLOMEW C, *et al.* Progression to AIDS in homosexual men co-infected with HIV and HTLV-I in Trinidad. **Lancet** v.2,1469. 1987

BLAS, M. *et al.* Norwegian scabies in Peru: the impact of human T cell lymphotropic virus type I infection. **Am J Trop Med Hyg.** v.72, n.6, p.855-7. 2005.

BLATTNER W.A., *et al.* The human type-C retrovirus, HTLV, in Blacks from the Caribbean region, and relationship to adult T-cell leukemia/lymphoma. **Int J Cancer** v.30,p.257-264. 1982

BRESLIN, E.M., *et al.* LY294002 and rapamycin co-operate to inhibit T-cell proliferation **British Journal of Pharmacology** v.144, p.791–800. 2005

BRITES, C. *et al.* Severe and Norwegian scabies are strongly associated with retroviral (HIV-1/HTLV-1) infection in Bahia, Brazil. **Aids.** v.16, n.9, p.1292-3. 2002.

BOXUS, M. and WILLEMS, L. Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation. **British Journal of Cancer** v.101, n.9, p.1497-1501. 2009

CARNEIRO-PROIETTI, A. B., J. G. Ribas, *et al.* 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. 2002

CARVALHO, E. M., *et al.* Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. **J Acquir Immune Defic Syndr** v.27, n.1, p, 1-6. 2001

CATALAN-SOARES, B.C., A., et al Os vírus linfotrópicos de células humanas (HTLV) na última década (1990-2000) – aspectos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**; v.4, p.82-95 2001

CAVROIS, M. *et al.* Proliferation of HTLV-1 infected circulating cells in vivo in all asymptomatic carriers and patients with TSP/HAM. **Oncogene**. v.12, n.11, p.2419-23. 1996.

CALATTINI, S.; *et al.* Discovery of a new human t-cell lymphotropic virus (htlv-3) in central africa. **Retrovirology**, v. 2, n.1, p.30, 2005.

COLLINS, S. J. *et al.* Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. **Nature**. v.270, n.5635, p.347-349. 1977

De CASTRO-COSTA CM, *et al.* Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). **AIDS Res Hum Retroviruses**. Oct;22(10):931-5. 2006

De THE´ G, BOMFORD R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? **AIDS Res Hum Retroviruses** ;9:381– 6. 1993

De LOURDES BASTOS, M.; *et al.* Prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in hospitalized patients with tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**. v.13, n.12, p.:1519-1523. 2009

DEHEE A, *et al.* Quantification of HTLV-1 proviral load by TaqMan real-time PCR assay. **J Virol Methods**; 102:37-51. 2002

DERSE D, *et al.* Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. **J Virol** v.75, p.8461–8468, .2001

DOURADO, I., *et al.* HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr**. v.34, n.5, p.527-31. 2003.

EIRAKU, N. *et al.* Clonal expansion within CD4+ and CD8+ T cell subsets in human T lymphotropic virus type I-infected individuals. **J Immunol**. v.161. n.12, p.6674-80. 1998.

EDLICH, R.F.; ARNETTE, J.A.; WILLIAMS, F.M. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). **J Emerg Med**. v.18, n.1, p.109-19. 2000.

FAKHFAKH, M.A. *et al.* Synthesis and biological evaluation of substituted quinolines: potential treatment of protozoal and retroviral co-infections. **Bioorg Med Chem**. v.11, n.23, p.5013-23. 2003.

FAN, *et al.* Infection of peripheral blood mononuclear cells and cell lines by cell-free human T-cell lymphoma/leukemia virus type I. **J Clin Microbiol** v.30,;p.905–910, 1992

- GALVAO-CASTRO, B. *et al.* Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**. v.37, n.2, p.242-3. 1997.
- GATZA, ML, *et al.* Cellular transformation by the HTLV-1 Tax protein, a jack-of-all-trades **Oncogene** v.22, p.5141–5149. 2003
- GESSAIN, A.*et al.* Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v.2, n.8452, p.407-10.1985.
- GESSAIN, A. *et al.* 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**. v.75, n.2, p.428-33. 1990.
- GETT, A.V.and HODGKIN, P.D. A cellular calculus for signal integration by T cells. **Nat. Immunol.** v.1, p.239. 2000
- GIVAN, A.L., *et al.* Use of Cell-Tracking Dyes to Determine Proliferation Precursor Frequencies of Antigen-Specific T Cells. **Flow Cytometry Protocols**. p.109-124. 2004
- GONÇALVES, D.U., *et al.* HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) Inflammatory Network. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v.7, p.98-107. 2008
- GOTO K, *et al.* The seroprevalence of human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I in patients with ocular diaseses, pregnant women and healthy volunteers in Kanto district, central Japan. **Scand J Infect Dis** v.29, p.219-221. 1997
- GRANT. *et al.* Dysregulation of TGF- β signaling and regulatory and effector T-cell function in virus-induced neuroinflammatory disease. **Blood** 111(12): 5601-5609. 2008
- GRAKOU, A, *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. **Science** v.285, p.221–227.1999
- GRASSI F. *et al.*, Quinoline compounds decrease in vitro spontaneous proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from human T-cell lymphotropic virus (HTLV) type-1-infected patients, **Biomed Pharmacother**, 2008
- HASBOLD, J., *et al.* Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. **Immunol. Cell Biol.** v.77, n.6, p.516. 1999
- HINUMA, Y. *et al.* Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.78, n.10, p.6476-80. 1981.

HIRAYAMA, M. *et al.* Infection of human t-lymphotropic virus type i to astrocytes in vitro with induction of the class ii major histocompatibility complex. **Neurosci Lett** v.92, n.1, p. 34-39, 1988.

HOFFMAN, P. M., *et al.* Human t-cell leukemia virus type i infection of monocytes and microglial cells in primary human cultures. **Proc Natl Acad Sci U S A** .v.89, n.24, p. 11784-11788, 1992

HOLLSBERG, P. Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v.63, n.2, p.308-333. 1999

HOLLSBERG, P. and HAFLER, D. A. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type I infection. **N Engl J Med** v.328, n.10, p. 1173-1182. 1993

IGAKURA T, *et al.* Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. **Science** V. 299, P.1713–1716, 2003

IJICHI, S., T. MATSUDA, *et al.* Arthritis in a human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) carrier." **Ann Rheum Dis** 49(9): 718-21. 1990

ITOYAMA, Y. *et al.* Spontaneous proliferation of peripheral blood lymphocytes increased in patients with HTLV-I-associated myelopathy. **Neurology**. v.38, n.8, p.1302-7. 1988.

JONES, K. S. *et al.* Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4⁺ T cells. **Nature Medicine** v.14, n.4, p.429-436 2008

KALYANARAMAN, V. S.; *et al.* A new subtype of human t-cell leukemia virus (htlv-ii) associated with a t-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, n. 4572, p. 571-573, 1982.

KASHALA, O. *et al.* Infection with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and human T cell lymphotropic viruses among leprosy patients and contacts: correlation between HIV-1 cross-reactivity and antibodies to lipoarabinomannan. **J Infect Dis**. v.169, n.2, p.296-304. 1994.

KRAMER, A. *et al.* Spontaneous lymphocyte proliferation in symptom-free HTLV-I positive Jamaicans. **Lancet**. v.2, n.8668, p.923-4. 1989.

KOHTZ, D. S., *et al.* 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. 1988.

LAGRENADE, L., B. Hanchard, *et al.* Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **Lancet** 336(8727): 1345-7. 1990

LIU, D. *et al.* Statistical determination of threshold for cellular division in the CFSE-labeling assay. **Journal of Immunological Methods** v.312, p.126–136. 2006

- LUNARDI-ISKANDAR, Y., *et al.* 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 **Journal of Experimental Medicine** v.177, n.3, p.741-750 1993
- MAGALHÃES, T., *et al.* Phylogenetic and Molecular Analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in northern of Brazil: Tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country. **Journal of Medical Virology**. 2008
- MANEL M. *et al.* The ubiquitous glucose transporter glut-1 is a receptor for htlv. **Cell** v.115, n.4, p. 449-459, 2003.
- MARINHO, J. *et al.* Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: A case-control study. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes** v.40, n.5, p.625-628. 2005
- MASCARENHAS, R.E. *et al.* Peripheral blood mononuclear cells from individuals infected with human T-cell lymphotropic virus type 1 have a reduced capacity to respond to recall antigens. **Clin Vaccine Immunol.** v.13, n.5, p.547-52. 2006.
- MATSUZAKI, T. *et al.* HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. **J Neurovirol.** V.7, p:228-34. 2001
- MEKOUAR, K. *et al.* Styrylquinoline derivatives: a new class of potent HIV-1 integrase inhibitors that block HIV-1 replication in CEM cells. **J Med Chem.** v.41, n.15, p.2846-57. 1998.
- MESNARD, J. *et al.* HBZ, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia. **Blood.** v. 108, n.13, p.3979-3982. 2006
- MOCHIZUKI, M., *et al.* HTLV-I and uveitis. **Lancet** 339(8801): 1110. 1992.
- MOREIRA, E. *et al.* Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in northeastern Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr.** v.6, n.8, p.959-63. 1993.
- MORGAN, O. S., P. Rodgers-Johnson, *et al.* HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. **Lancet** 2(8673): 1184-7. 1989.
- MURPHY, E. L. *et al.* Modelling the risk of adult t-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human t-lymphotropic virus type i. **Int J Cancer**, v.43, n.2, p. 250-253, 1989
- NAGAIL, M.; *et al.* Analysis of HTLV-1 proviral load in 202 TSP/HAM patients and 243 asymptomatic HTLV-1 carriers: high proviral load strongly predisposes to TSP/HAM. **J. Neurovirol.** V.4, p.586-593, 1998
- NICOT C, *et al.* HTLV-1 p12^I protein enhances STAT5 activation and decreases the interleukin-2 requirement for proliferation of primary human peripheral blood mononuclear cells **Blood** .v.98,p.823–829. 2001

OLINDO, S. *et al.* HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. **J Neurol Sci.** v.237, n.1-2, p.53-9. 2005.

OSAME M, *et al.* HTLV-I- associated myelopathy (HAM), treatment trials, retrospective survey, and clinical and laboratory findings. **Hematol Rev** v.3, p.271–284, 1990

PAGE JB, *et al.* HTLV I/II seropositivity and death from AIDS among HIV-I seropositive intravenous drug users. **Lancet** v.335, p.1439–41. 1990

PEDRAL-SAMPAIO, D.B. *et al.* Co-Infection of Tuberculosis and HIV/HTLV Retroviruses: Frequency and Prognosis Among Patients Admitted in a Brazilian Hospital. **Braz J Infect Dis.** v.1. n.1, p.31-35. 1997.

POIESZ, B. J.; *et al.* Detection and isolation of type retrovirus particles from fresh and culture lymphocytes of a patient with cutaneous t-cell lymphoma. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.77, n. 12, p.7415-7419, 1980.

POPOVIC, M., *et al.* Transformation of human umbilical cord blood T cells by human T-cell leukemia/lymphoma virus. **Proc Natl Acad Sci USA** v.80, n.17, p. 5402-5406. 1983

POPOVIC, M., *et al.* Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-I or HTLV-II. **Science** 226(4673):459-62. 1984

PORTO, A.F. *et al.* HTLV-1 modifies the clinical and immunological response to schistosomiasis. **Clin Exp Immunol.** v.137, n.2, p.424-9. 2004.

PORTO, M.A. *et al.* Clinical and immunological consequences of the association between HTLV-1 and strongyloidiasis. **Rev Soc Bras Med Trop** v.35, n.6, p.641-9. 2002

PRINCE, H.; *et al.* Immunologic correlates of spontaneous lymphocyte proliferation in human t-lymphotropic virus infection. **Blood** v.78, n.1, p.169-174, 1991

PRINCE, H.; *et al.* Spontaneous proliferation of memory (cd45ro+) and naive (cd45ro-) subsets of cd4 and cd8 cells in human t lymphotropic virus (htlv) infection: Distinctive patterns for htlv-i versus htlv-ii. **Clin Exp Immunol** v.102, n.2, p.256-261, 1995

REGO, F.F.A., *et al.* HTLV-1 Type 1 Molecular Study in Brazilian Villages with African Characteristics Giving Support to the Pos-Columbian Introduction Hypothesis. **AIDS Res and Hum Retov** 5(24):673 -676. 2008

RICHARDSON, J.H., *et al.* In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. **J Virol** v.64, p.5682–5687. 1990

ROMERO, I. A., *et al.* 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** p. 6021-6030. 2000

- ROUCOUX DF, MURPHY EL. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. **AIDS Reviews** 6: 144-154, 2004.
- SANTOS, S.B. *et al.* Clinical and immunological consequences of human T cell leukemia virus type-I and *Schistosoma mansoni* co-infection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 9, n.5, p.121-126. 2004
- SATO, Y. and SHIROMA, Y.; *et al.* Concurrent infections with *Strongyloides* and T-cell leukemia virus and their possible effects on immune responses of host. **Clin Immunol Immunopathol** v. 2, n.52, p. 214-224. 1989
- SEMMES, O. J., *et al.* HTLV-I and HTLV-II Tax: Differences in induction of micronuclei in cells and transcriptional activation of viral LTRs. **Virology** v.217, n.1, p.373-379. 1996
- SODROSKI, J. The human T-cell leukemia virus (HTLV) transactivator (Tax) protein. **Biochim Biophys Acta** v. 1114, n.1, p. 19-29. 1992
- SUGIMOTO; MITA. 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.** v.6, n.7, p.938-43. 1993.
- SUZUKI, T., *et al.* Tax protein of HTLV-1 inhibits CBP/p300-mediated transcription by interfering with recruitment of CBP/p300 onto DNA element of E-box or p53 binding site." **Oncogene** v.18, n.28, p. 4137-4143. 1999
- TAKESHITA, T.; TAKESHITA, H. Crusted (Norwegian) scabies in a patient with smoldering adult T-cell leukemia. **J Dermatol.** v.27, n.10, p.677-9. 2000.
- TAKATSUKI K, *et al.*. ATLL and HTLV-I related diseases. In: Takatsuki K, ed. Adult T-cell Leukemia. **Oxford: Oxford University** v.1, n.27. 1994
- TAYLOR, G. P.; *et al.* Zidovudine plus lamivudine in human t-lymphotropic virus type-i-associated myelopathy: A randomized trial. **Retrovirology** v.3, p.63. 2006
- TEKLE-HAIMANOT, *et al.* A survey of HTLV-1 and HIVs in Ethiopian leprosy patients. **Aids** 5(1):108-10. 1991.
- VERNANT, J. C. *et al.* Endemic tropical spastic paraparesis associated with human T-lymphotropic virus type I: a clinical and seroepidemiological study of 25 cases. **Ann Neurol.** v.21, n.2, p.123-30. 1987.
- WANG, X., *et al.* Inhibition of the tax-dependent human t-lymphotropic virus type i replication in persistently infected cells by the fluoroquinolone derivative k-37. **Mol Pharmacol** v.61, n.6, p. 1359-1365. 2002
- WATTEL, E.,*et al.* Clonal expansion of infected cells: A way of life for htlv-i.**J. Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, v.13, Suppl 1, p. 92-99, 1996.

WELLS, S. L. *et al.* Decreased reactivity to PPD among HTLV-I carriers in relation to virus and hematologic status. **Int J Cancer**. v.56, n.3, p.337-40. 1994.

WOLFE, N. D., *et al.* Emergence of unique primate t-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n.22, p. 7994-7999, 2005.

YAMASAKI, K. *et al.* Long-term, high dose interferon-alpha treatment in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: a combined clinical, virological and immunological study. **J Neurol Sci** v.147, n.2, p.135-44. 1997.

YAMANO, Y., *et al.* Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. **J Clin Invest** v.115, n.5, p.1361-1368. 2005

YOSHIDA, M. *et al.* Molecular mechanisms of regulation of HTLV-1 gene expression and its association with leukemogenesis. **Genome**. v.31, n.2, p.662-7. 1989.

YOSHIDA M Discovery of HTLV-1, the first human retrovirus, its unique regulatory mechanisms, and insights into pathogenesis **Oncogene** v.24, n.5, p.5931–5937. 2005

ZANE, L. *et al.* Clonal expansion of HTLV-1 infected cells depends on the CD4 versus CD8 phenotype. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library** v.14,p.3935-3941. 2009

ZOUHIRI, F. *et al.* Structure-activity relationships and binding mode of styrylquinolines as potent inhibitors of HIV-1 integrase and replication of HIV-1 in cell culture. **J Med Chem**. v.43, n.8, p.1533-40. 2000.