



UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**ATIVAÇÃO CELULAR, PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE
NAS PATOLOGIAS ASSOCIADAS AO HTLV-I**

DANIELE DECANINE

**Salvador - Bahia - Brasil
2006**



002575

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**ATIVAÇÃO CELULAR, PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE NAS
PATOLOGIAS ASSOCIADAS AO HTLV-1**

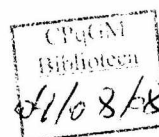
DANIELE DECANINE

Orientador: Dr. Johan Van Weyenbergh

Tese apresentada para a obtenção do grau de
Doutor em Patologia, área de concentração em
Patologia Experimental

Salvador - Bahia

2006



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

D291a Decanine, Daniele
Ativação celular, proliferação e apoptose nas patologias associadas ao HTLV-I
[manuscrito] / Daniele Decanine. - 2006.
111 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz, 2006.

Orientador: Prof. Dr. Dr. Johan Van Weyenbergh, Laboratório de Imunoregulação
e Microbiologia.

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

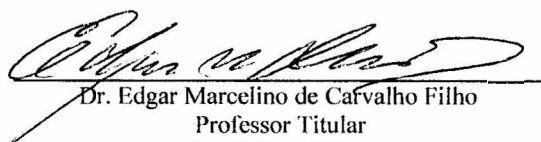
CDU 578.28:616.98

“Ativação Celular, Proliferação e Apoptose nas patologias associadas ao HTLV-I”

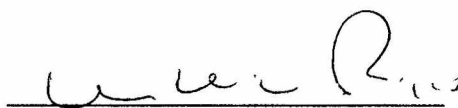
DANIELE DECANINE

FOLHA DE APROVAÇÃO

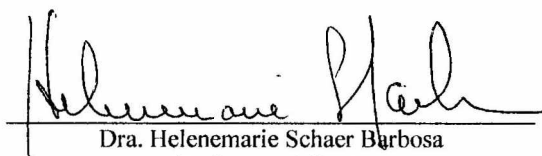
COMISSÃO EXAMINADORA



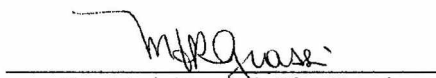
Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho
Professor Titular
FAMED - UFBA




Dr. Luiz Vicente Rizzo
Professor Associado
USP



Dra. Helenemarie Schaer Barbosa
Professora Adjunta
FAMED - UFBA



Dra. Maria Fernanda Rios Grassi
Pesquisadora Adjunta
CPqGM-FIOCRUZ



Dr. Johan Van Weyenbergh
Pesquisador Associado
CPqGM-FIOCRUZ

*Dedico este trabalho aos meus pais, **Rui Decanine e Valquiria da Costa Decanine**, pelo amor incondicional e pelo apoio e incentivo em todos os dias da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus

Ao Dr. Johan Van Weyenbergh
Pela orientação, dedicação e incentivo.

Ao Dr. Manoel Barral Netto e Dra. Aldina Barral, pelo apoio e por ter me concedido a oportunidade de integrar o quadro de pesquisadores do LIMI.

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

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

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

À Dra. Marilda Gonçalves, pelo carinho, incentivo e colaboração no desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e na elaboração do projeto de qualificação.

À Dra. Claudia Ida Brodskyn pelo apoio durante a elaboração do projeto de qualificação.

À Dra. Achiléa Bittencourt pela disponibilização dos pacientes com ATL (Hospital Universitário Professor Edgard Santos-HUPES)

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

Ao Dr. Eduardo Ramos pela colaboração e disponibilização do material para as técnicas de histopatologia.

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

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

À Silvia Cardoso, José Carlos, Lucyvera Imbroinise, Camila Mota e Elze Leite, pelo carinho e apoio em todos os momentos necessários.

Aos amigos especiais, Claudiane Junqueira, Leila Karine Novaes Soares, Franklin Barbalho Magalhães, Marco Silvany, George Mariane Soares, Clarissa Romero Teixeira, Tatiana Moura, Gilvanéia Santos, Aline Báfica, André Báfica, Jorge Tolentino, Joiza Monti, Ricardo Khouri, Ana Paula Almeida, Gisélia Santana, Theolis

Barbosa, Vera Vinhas, Sebastião Martins de Souza Neto, Natali Alexandrino, Cláudio Paulo Santos e Saul Schnitman por terem compartilhado momentos alegres e difíceis no decorrer destes anos.

Aos meus vizinhos Jane e Patrícia Luz, Uarib Reazak, Lidsy Fonseca e Elias Chalfun Dias, que se tornaram parte da minha família.

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

Aos amigos do LETI, José Fernando Oliveira Costa, Mateus Santos de Sá, Juliana Fraga Vasconcelos e Daniele Brustolin pela amizade e ajuda no desenvolvimento das técnicas de blastogênese.

Às técnicas e estudantes da histopatologia (UNIH), Cristina dos santos Vasconcelos, Aline Maria D'Oliva de Cerqueira, Jacqueline Carvalho da Silva, Anna Clara Cunti, Joseane Miranda Correa, Missilene de Queiroz, Creuza Vasconcleos dos Santos e Camila Nunes Sampaio pelo apoio e disponibilização do material necessário para a preparação das lâminas.

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

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

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

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

Ao CNPq pelo suporte financeiro para o desenvolvimento da tese.

LISTA DE ABREVIATURAS

AICD	Morte celular induzida por ativação
ATL	Leucemia de células T no adulto
AZT	Zidovudina
CD	Código de diferenciação
CDNA	DNA complementar
COM	Contagem de células por minuto
CRE	Elementos responsivos do cAMP
CTL	Linfócitos T citotóxicos
DD	Domínio de Morte
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	Técnica de ensaio imunoenzimático
FACS	Separador de células ativadas por fluorescência
FITC	Isoticianato de fluoresceína
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de granulócitos e macrófagos
HAM/TSP	Mielopatia associada ao HTLV-I/Paraparesia espástica tropical
HIV	Vírus da imunodeficiência Adquirida
HLA	Antígeno de histocompatibilidade leucocitário
HTLV-I	Vírus linfotrópico para células T humanas
JAK/STAT	Janus Kinase/ Ativador de Transcrição e Transdutor de Sinal
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IRF-I	Fator regulador de interferon-I
IDU	Usuários de drogas injetáveis
LPS	Lipolissacarídeo
LTR	Seqüências terminais repetidas
MFI	Intensidade mediana de fluorescência
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal
MRNA	RNA mensageiro

MTOC	Centro de organização de microtúbulos
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear do gene- κ nas células B
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade óptica
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação de polimerase em cadeia
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PE	Ficoeritrina
PTHrP	Proteína relacionada ao paratormônio
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcriptase reversa
SNC	Sistema nervoso central
SRE	Elementos responsivos ao soro
TGF- β	Fator de crescimento de células T
Th	Linfócitos T auxiliares
TNF-R	Receptor de TNF
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TRAIL	Ligante e indutor de apoptose relacionado ao TNF

RESUMO

ATIVACÃO CELULAR, PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE NAS PATOLOGIAS ASSOCIADAS AO HTLV-I. **Daniele Decanine**. O HTLV-I é o agente etiológico da Leucemia/Linfoma de células T no adulto (ATL), da Mielopatia Associada ao HTLV-I/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), e de outras patologias. Os IFN- α e IFN- β foram recentemente introduzidos no tratamento de ATL e HAM/TSP, embora seus mecanismos de ação ainda estejam pouco esclarecidos. A presença da iNOS e seu recém-descoberto papel anti-apoptótico na ATL inciou novas perspectivas terapêuticas. Considerando o provável papel da ativação e proliferação linfocitária induzida pelo HTLV-I nas patologias associadas, buscamos estudar a regulação molecular e celular da ativação celular, linfoproliferação e apoptose ex vivo e in vitro em indivíduos soropositivos assintomáticos, pacientes com HAM/TSP e pacientes com ATL. Observamos uma correlação significativa do estágio clínico na HAM/TSP com a linfoproliferação in vitro e com a expressão de CD80 em células B ex vivo. O efeito marcante do IFN- β no aumento da expressão in vitro de Fas e CD86, sugere a utilização destas moléculas como possíveis marcadores biológicos do uso clínico dos IFNs. Observamos que, apenas o IFN- β , mas não o IFN- α , mostrou atividade anti-proliferativa significativa, mas não pró-apoptótica in vitro nos pacientes com HAM/TSP, ATL e em doadores normais. Porém, as células mostraram-se sensíveis ao estímulo com anti-CD3 na indução da apoptose, sugerindo que os IFNs, principalmente o IFN- β possui efeitos anti-proliferativos e o anti-CD3 pró-apoptóticos. Em relação ao inibidor da iNOS, não observamos nenhum efeito anti-proliferativo e/ou pró-apoptótico nos indivíduos infectados por HTLV-I. De acordo com nossos resultados, o conhecimento de marcadores biológicos e o uso combinado de IFN- β e outras drogas pró-apoptóticas, como o anti-CD3, poderia ser considerado em futuros ensaios terapêuticos em HAM/TSP ATL.

Palavras-chave: 1. Apoptose. 2. HTLV-I. 3. Mielopatia. 4. Leucemia. 5. Interferons

ABSTRACT

CELLULAR ACTIVATION, PROLIFERATION AND APOPTOSIS IN HTLV-I-ASSOCIATED PATHOLOGY. **Daniele Decanine**. HTLV-I is the etiologic factor for ATL (Adult T cell Lymphoma), HTLV-I-associated myelopathy (HAM), as well as other pathologies. Interferon (IFN)- α e - β have been shown to be effective in ATL e HAM, but their mechanism of action remains unclear. Recently, the presence of iNOS and its anti-apoptotic effect has been demonstrated in ATL, initiating new perspectives for therapy. Considering the correlation between HTLV-I induced lymphoproliferation and associated pathologies, we investigated the cellular activation, lymphoproliferation and apoptosis ex vivo and in vitro in seropositive asymptomatic individuals, ATL and HAM/TSP patients. We found that ex vivo expression of CD80 in B cells and in vitro lymphoproliferation significantly correlacionates with clinical stage in HAM/TSP. The marked effect of IFN- β upon in vitro expression of Fas and CD86 suggests their possible use as biological markers in clinical evaluation. IFN- β displayed significantly increased anti-proliferative activity, as compared to IFN- α , in HAM/TSP, ATL and health donors. However, only anti-CD3 stimulation was able to exert a significant pro-apoptotic effect in vitro, in all groups studied. Inhibition of iNOS had no significant anti-proliferative or pro-apoptotic effect in HTLV-I-infected individuals. In summary, this study points at the possible use of IFN- β , in combination with pro-apoptotic drugs such anti-CD3, as a therapeutic strategy in HAM/TSP and ATL.

Key words: 1. Apoptosis. 2. HTLV-I. 3. Myelopathy. 4. Leukemia 5. Interferons.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DO HTLV-I.....	15
1.2	RESPOSTA IMUNE CELULAR AO HTLV-I.....	16
1.3	APOPTOSE.....	21
1.3.1	Apoptose na infecção por HTLV-I.....	24
1.4	FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR A APOPTOSE E A PROLIFERAÇÃO CELULAR NA INFECÇÃO POR HTLV-I.....	26
1.4.1	O papel dos IFNs.....	26
1.4.2	O papel da iNOS.....	27
2	OBJETIVOS	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	POPULAÇÃO ESTUDADA.....	30
3.1.1	Assintomáticos e Pacientes HAM/TSP.....	30
3.1.2	Doadores Normais.....	31
3.2	ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS.....	31
3.3	QUANTIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	32
3.4	ESTUDO DO FENÓTIPO CELULAR - Citometria de Fluxo.....	33
3.4.1	Marcação, ex vivo, de moléculas de superfície celular.....	33
3.4.1.1	<u>Células do sangue total</u>	33
3.4.1.2	<u>Células Mononucleares do Sangue Periférico</u>	34
3.4.2	Marcação, in vitro, de moléculas de superfície celular.....	34
3.4.3	Aquisição e Análise de Dados.....	35
3.5	FRAGMENTAÇÃO NUCLEAR-Citocentrifugação.....	35
3.6	ELISA PARA DETECÇÃO DE APOPTOSE.....	36
3.7	DOSAGEM DE NITRATO E NITRITO.....	36
3.8	ANÁLISE DE DADOS.....	37
4	RESULTADOS	38

5	DISCUSSÃO.....	73
6	CONCLUSÕES.....	81
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
	ANEXOS.....	103

1 INTRODUÇÃO

O HTLV-I é um vírus linfotrópico de células T humanas, que pertence ao gênero Deltavirus da família Retroviridae de vírus RNA que se replica pela transcrição do seu material genético em moléculas de DNA, as quais se integram no genoma da célula hospedeira. Do ponto de vista patogênico, o HTLV é classificado como sendo da subfamília Oncovirinae devido ao fato de que tanto o HTLV-I quanto o HTLV-II podem causar a imortalização e a transformação celular (MANNIS *et al.*, 1999).

Indivíduos infectados por HTLV-I têm sido identificados entre usuários de drogas e imigrantes residentes nos EUA e na Europa, sendo esta infecção encontrada em diversas partes do mundo com uma distribuição desigual, onde a soroprevalência varia de 0,1% a 30% em áreas costeiras. Está estimado que aproximadamente 10 a 20 milhões de pessoas no Mundo todo são portadoras desse vírus e as áreas de maior endemicidade para o HTLV-I são o Japão, Ilhas do Caribe, parte da África Central, sudeste da Ásia, bem como parte da América Central e do Sul (principalmente na Colômbia e as regiões Sudeste e Nordeste do Brasil) e regiões da Melanésia (BANGHAM, 2000).

No Brasil, a prevalência média entre doadores de sangue é cerca de 20 a 100 vezes maior do que a relatada nos EUA e Europa, estando em torno de 0,45% (GALVÃO-CASTRO *et al.*, 1997). Atualmente, o HTLV-I está presente em todas as regiões do Brasil, tornando o país uma das maiores áreas endêmicas do Mundo com a prevalência da infecção bastante heterogênea no que diz respeito a sua distribuição geográfica (CATALAN-SOARES *et al.*, 2005), sendo que, dentre as capitais

brasileiras, Salvador é a cidade que detém a maior prevalência de indivíduos infectados (1,76%) num estudo populacional (DOURADO *et al.*, 2003).

A transmissão do HTLV-I ocorre predominantemente por via vertical, onde um número considerável de soropositivos adquire a infecção congenitamente de mãe para filho (amamentação, via pré-natal e sangue transplacentário), ou ainda por via horizontal, por intermédio do contato sexual ou por via parenteral (transfusão sanguínea e uso de seringas contaminadas) (KINOSHITA *et al.*, 1984; MAEDA *et al.*, 1984; KAJIYAMA *et al.*, 1986). Em Salvador, a frequência da infecção pelo HTLV-I entre mulheres grávidas é relativamente elevada, sendo a infecção materna por intermédio da amamentação a mais provável e a transmissão sexual a segunda via mais importante (BITTENCOURT *et al.*, 2001).

Em usuários de drogas injetáveis (IDU) a transmissão horizontal, por meio da utilização de seringas e/ou agulhas contaminadas, apresenta uma prevalência, em Salvador, de 22% em homens e de 46,2% em mulheres (DOURADO *et al.*, 1999). A transmissão horizontal, por intermédio do contato sexual, é mais expressiva do homem para a mulher (60%) (KAJIYAMA *et al.*, 1986) e a prevalência dessa infecção aumenta com a idade sendo duas vezes maior em mulheres, especialmente nos grupos etários acima de 40 anos (MURPHY *et al.*, 1991; KAJIYAMA *et al.*, 1986; SARIM *et al.*, 1990; MANNS *et al.*, 1991) indicando que provavelmente esta diferença surge a partir de uma infecção em mulheres em idade sexualmente ativa.

A infecção pelo HTLV-I pode levar ao desenvolvimento de patologias distintas como a Leucemia/Linfoma de células T no adulto (ATL), a Mielopatia Associada ao HTLV-I/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP) e outras como a dermatite infecciosa e a uveíte (MANNS *et al.*; 1999). Dentre os indivíduos infectados, um número considerável de soropositivos desenvolve ATL (2-3 %) (KONDO *et al.*; 1987),

cerca de 5% desenvolvem HAM/TSP e a soma das prevalências descritas para as patologias associadas ao HTLV-I encontra-se em torno de 10% (DE THÉ, 1993), sendo que a maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática.

HAM/TSP é uma doença neurodegenerativa progressiva de início insidioso cuja resposta imune é exacerbada envolvendo destruição celular no sistema nervoso central (SNC) com áreas de desmielinização particularmente no trato corticoespinal da medula espinhal, cujos danos são mais severos na região posterior da região torácica provocando espasticidade, paraparesia, hiperreflexia e sinal de Babinski que são sintomas característicos desta doença (UMEHARA *et al.*, 1993).

A segunda patologia mais prevalente, associada ao HTLV-I, é a Leucemia/Linfoma de células-T no Adulto (ATL), uma resposta linfoproliferativa agressiva, causada por uma integração monoclonal do vírus acompanhada por uma imunodeficiência via expressão de moléculas imunorregulatórias na superfície celular e produção de citocinas imunossupressoras, além da presença de células TCD4+ ou TCD8+ ativadas expressando CD25 (MATSUOKA, 2005). Trata-se de um linfoma de células T maduras com uma fase leucêmica caracterizada pela presença de linfócitos ativados (CD4+CD25+) no sangue periférico, lesões cutâneas, linfadenopatia generalizada, hepatoesplenomegalia, linfocitose periférica, hipercalcemia e o aparecimento de células tumorais com o núcleo multilobulado (*flower cells*) (YAMAGUCHI e WATANABE 2002). Vários estudos têm implicado a proteína viral *tax* como tendo um papel importante na patogênese da transformação maligna, visto que a *tax* possui uma capacidade de ativar vários genes virais e celulares (FRANCHINI, 1995; UCHIYAMA, 1997; ROSS *et al.*, 1996). Desta forma, considera-se atualmente a *tax* uma proteína oncogênica sem um homólogo celular.

1.1 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DO VÍRUS

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

O gene *gag* (antígeno grupo-específico) codifica as proteínas virais gp19 (proteína da matriz), gp24 (proteína do capsídeo) e gp15 (proteína do nucleocapsídeo); o gene *pol* (protease/polimerase) codifica a Transcriptase Reversa (RT) e a Integrase; e o gene *env* (envelope) codifica as proteínas do envelope viral, a proteína transmembrana gp21 e a glicoproteína de superfície gp46 (FRANCHINI, 1995). Na infecção da célula hospedeira a região *env* é responsável pela adsorção do vírus, fusão da membrana viral com a membrana celular seguido de liberação do víriom no citoplasma (MANEL *et al.*, 2005). O desvio de leitura da região *gag* e *pol*, no genoma do HTLV-I, codificam a protease que é responsável pela clivagem das cadeias poliprotéicas formando proteínas estruturais maduras (MANEL *et al.*, 2005; FRANCHINI, 1995).

As proteínas regulatórias Tax e Rex são responsáveis por transativar à replicação e a transcrição viral (FRANCHINI, 1995). A Tax transativa a transcrição viral e regula a expressão de genes celulares e a Rex é responsável pela regulação

pós-transcricional do genoma por meio do controle do *splicing* do mRNA viral (HOLLSBERG, 1999; YOSHIDA, 2001).

A proteína Tax atua na ativação do fator transcricional do genoma humano, o NF- κ B, levando à transcrição de vários genes envolvidos na resposta imune inflamatória, responsável, também, pela imortalização e sobrevivência das células infectadas (HARHAJ *et al.*, 2005) por meio da indução a um aumento da expressão de diferentes genes relacionados com o crescimento celular, como os protooncogenes *c-fos*, *c-myc*, *c-sis* e *erg* e fatores de crescimento e/ou seus receptores como as interleucinas-1 (IL-1), 2 (IL-2), 3 (IL-3) e 6 (IL-6), cadeia α do receptor para IL-2 (IL-2R α), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), fator estimulante de colônia de macrófagos (GM-CSF) fator de crescimento tumoral β (TGF- β), proteína relacionada ao paratormônio (PTHrP), vimentina (proteína do citoesqueleto), complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC-I) e fator de necrose tumoral β (TNF- β) (FRANCHINI, 1995).

1.2 RESPOSTA IMUNE CELULAR AO HTLV-I

O HTLV-I possui um tropismo especial para células TCD4⁺ (RICHARDSON *et al.*, 1990), entretanto pode infectar outros tipos celulares como também linfócitos TCD8⁺ *in vivo*, desencadeando uma proliferação clonal espontânea similar à desencadeada por células TCD4⁺ (WUCHERPFENNIG *et al.*, 1992; NAGAI *et al.*, 2001).

A infecção e propagação do vírus no organismo ocorrem mais eficientemente por intermédio da interação entre células T, onde partículas intracelulares e RNA viral são transferidas para a célula hospedeira, do que por meio de vírions livres (HÖLLSBERG, 1999). As células infectadas sofrem uma reorganização dos componentes virais, semelhante ao observado na sinapse imunológica, onde é observada uma polarização das proteínas *gag* e *env* para a área de contato celular e uma polarização do centro de organização dos microtúbulos (MTOC) facilitando a transmissão entre as células T, processo denominado como sinapse viral (IGAKURA *et al.*, 2003).

A interação de células TCD4⁺ infectados com células TCD4⁺ não infectadas promove a geração de células progenitoras carreadoras do vírus e são mediadas pela expressão de moléculas coestimulatórias como CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) (TAKAMOTO *et al.*, 1997). Por outro lado, linfócitos T CD4⁺ infectados e ativados por HTLV-I também expressam epitopos virais que podem causar uma ativação de células precursoras T CD8⁺ citotóxicas antivirais restritas ao MHC-I (*apud* BUCLKE *et al.*, 1996) ou desencadear uma resposta autoimune por meio do reconhecimento de antígenos próprios ou peptídeos virais no contexto MHC II, na ausência da expressão das moléculas coestimulatórias CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) (SCHOLZ *et al.*, 1996).

A percentagem de células TCD8⁺ ativadas e também de linfócitos B circulantes é um importante indicador imunológico que pode auxiliar o monitoramento das patologias associadas, uma vez que a diminuição das células B resultou em um aumento na razão linfócitos T/B e um aumento na porcentagem de linfócitos T CD8⁺ HLA-DR positivos, exclusivamente em pacientes com HAM/TSP (BRITO-MELO *et al.*, 2004).

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

A proteína Tax é a proteína viral caracterizada como antígeno alvo para os CTLs HTLV-I específicos (JACOBSON *et al.*, 1990; KANNAGI *et al.*, 1991) podendo ser secretada pelas células infectadas e agir como uma citocina extracelular, sendo internalizada e processada para a apresentação de antígenos virais ou transportada para o núcleo, onde vai agir como fator transcricional ativador (*apud* MOSTOLLER *et al.*, 2004).

Outras proteínas virais, entretanto, têm sido propostas como a Gag, Pol e Env (JACOBSON *et al.*, 1990; PARKER *et al.*, 1992) além de outras pequenas proteínas regulatórias, incluindo Tof e Rof (PIQUE *et al.*, 2000) atuando como peptídeos participantes no reconhecimento de CTLs e ativação da resposta imune.

As células infectadas com o vírus HTLV-I aumentam a expressão dos seus marcadores de superfície, assim como as moléculas coestimulatórias CD80/86, concomitante à indução de uma proliferação espontânea de linfócitos T, que pode levar ao estabelecimento de uma infecção persistente (MAEDA *et al.*, 1997; RICHARDSON *et al.*, 1997) e ativação generalizada do sistema imune, podendo ser o ponto chave para o desenvolvimento das patologias associadas (BUCKLE *et al.*, 1996). A proliferação exacerbada de linfócitos T é um efeito direto da infecção e ocorre devido à ativação do NF- κ B promovendo a ativação do promotor de determinados genes da célula T (IL-2, IL-2R α , IL-15 e IL-15R α) (CERESETO *et al.*, 1996; WODARZ *et al.*, 1999; AZIMI *et al.*, 1999).

Secreção autócrina de IL-2 é baixa em linfócitos T infectados por HTLV-I e a via IL-2R pode ser ativada pela IL-15 (GIRI *et al.*, 1994; BAMFORD *et al.*, 1994) que se liga às cadeias β e γ do receptor IL-2R, assim como a IL-2, induzindo elementos sinalizadores JAK/STAT levando a proliferação de todas as subpopulações de células T ativadas (*apud* WALDMANN *et al.*, 2001). A IL-15 ainda manifesta ações anti-apoptóticas atuando como fator de crescimento e inibindo a morte celular induzida por ativação (AICD), além de estimular a homeostase das células TCD8⁺ de memória (ZHANG *et al.*, 1998; *apud* WALDMANN *et al.*, 2001; MARKS-KONCZALIKI *et al.*, 2000).

A infecção com HTLV-I, além de desregular os mecanismos de ativação e proliferação celular, também modula diferencialmente a produção de citocinas *in vitro* (MACCHI *et al.*, 1998), causando um aumento na secreção policlonal de IL-4, IL-6, IL-5, TNF- α , IL-10 e IFN- γ na maioria dos indivíduos soropositivos, incluindo os assintomáticos (MACCHI *et al.*, 1997; CARVALHO *et al.*, 2001). Esse vírus também é capaz de interferir com o perfil de citocinas produzido por clones de células TCD4⁺ Th1 e Th2 já estabelecidos, o que difere dos doadores normais (MACCHI *et al.*, 1998).

Na Leucemia de células T no Adulto (ATL), estudos demonstram que a proteína viral Tax estimula a expressão de genes celulares envolvidos no início da leucemização, incluindo proteínas regulatórias do ciclo celular, citocinas/ fatores de crescimento (IL-2, IL-2R α , GM-CSF e IL-6) e fatores de transcrição (CREB, Fos/Jun, Nf- κ B/Rel, Egr/Krox, *c-myc*) (HISCOTT *et al.*, 1995). Podem, também, ativar o promotor IRF-4 (fator regulador de IFN-4), como observado em células T infectadas com HTLV-I e em células Jurkat transfectadas com tax (YAMAGATA *et al.*, 1996).

Em pacientes com HAM/TSP, um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , apresenta-se muito mais exacerbada do que em indivíduos assintomáticos (NISHIURA *et al.*, 2004; WATANABE *et al.*, 1995; UMEHARA *et al.*, 1994; MATSUI e KURODA, 1997) indicando que a resposta imune inflamatória desempenha um importante papel no desenvolvimento da doença (MACCHI *et al.*, 1997; CARVALHO *et al.*, 2001; YAMANO *et al.*, 2002; FURUKAWA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2004).

Entretanto, estudos com indivíduos infectados assintomáticos, demonstram que se trata de um grupo bem heterogêneo em relação à expressão da proteína viral Tax, à resposta proliferativa e à produção de citocinas inflamatórias (MACCHI *et al.*, 1997; CARVALHO *et al.*, 2001). Santos e colaboradores (2004) compararam alguns aspectos da resposta imune em pacientes com HAM/TSP e assintomáticos, demonstrando que o grupo de indivíduos assintomáticos apresentou uma proliferação de linfócitos e produção de IFN- γ similar a encontrada em pacientes com mielopatia. Tal fato poderia indicar uma possível progressão da infecção nesses indivíduos tomando como base o fato de que a grande maioria dos assintomáticos apresentou uma resposta proliferativa e inflamatória diminuída em relação aos pacientes.

Um outro grupo de pesquisadores observou uma produção maior de citocinas inflamatórias, como por exemplo, IFN- γ e TNF- α , em células expressando Tax de indivíduos assintomáticos, com carga viral elevada, do que em pacientes com HAM/TSP, sugerindo que a produção de citocinas inflamatórias, principalmente o IFN- γ , nesses indivíduos seria um dos fatores importantes para o desenvolvimento da mielopatia associada ao HTLV-I (FURUKAWA *et al.*, 2003).

Em geral, o IFN- γ induz MHC de classe II e pode levar a uma resposta imune celular com destruição do sistema nervoso central (MOORE *et al.*, 1989) indicando

um possível papel deletério do IFN- γ nas patologias associadas ao HTLV-I (KUBOTA *et al.*, 2000). No entanto, os interferons IFN- α e IFN- β , considerados IFN do tipo I possuem uma ação antiviral, anti-proliferativa e imunomodulatória e vem sendo utilizado na clínica demonstrando um efeito benéfico na ATL (MAHIEUX e HERMINE, 2005; HERMINE *et al.*, 1995), na HAM/TSP (IZUMO *et al.*, 1996; OH *et al.*, 2005) e na esclerose múltipla, que é uma outra doença com perfil neurodegenerativo (HUA *et al.*, 1998).

Os IFN- α e IFN- β possuem efeitos pleiotrópicos no sistema imune, incluindo a regulação da expressão de MHC de classe I e II em todos os tipos celulares e a ativação de células dendríticas imaturas, levando ao aumento de quimiocinas, receptores de quimiocinas e moléculas coestimulatórias (CD40, CD80, CD86). A maturação de células dendríticas induzida por esses IFNs pode também promover um *cross-priming* de células T CD8⁺ após a infecção viral (LE BON *et al.*, 2003).

Os IFN do tipo I também são capazes de manipular eventos mediadores de morte celular programada por intermédio de uma regulação transcricional de proteínas pró e anti-apoptóticas (ARNOLD *et al.*, 1999; PILLING *et al.*, 1999).

1.3 APOPTOSE

A apoptose é descrita como morte celular programada, a qual possui papel importante na regulação do sistema imune. Está envolvida na homeostase celular durante o desenvolvimento embriológico (embriogênese), na involução de tecidos

hormônio-dependente, na regressão de tumores e no envelhecimento, além de participar de alguns processos patológicos (CUMMINGS *et al.*, 1997).

A morte celular programada afeta, comumente, células individuais e é identificada como um processo ativo, porém silencioso, o que não induz inflamação. Apresenta características morfológicas distintas da necrose como a redução de tamanho celular, condensação da cromatina em direção à membrana nuclear, fragmentação nuclear e rompimento da célula em vesículas com organelas intactas e fragmentos nucleares (chamados de corpos apoptóticos), que são fagocitados por macrófagos ou células vizinhas (GRANVILLE *et al.*, 1998; HOCKENBERY, 1995).

A degradação do DNA em fragmentos de 50 a 300 Kb é uma das características principais da apoptose e pode ocorrer devido mecanismos indutores distintos, caracterizados como extrínsecos e intrínsecos. Esses eventos, sinalizadores extrínsecos ou do tipo I, referem-se aos receptores de superfície, como o fator de necrose tumoral (TNF) expresso em macrófagos, células B, células T e células NK; o Fas (CD95) expresso em células normais e ativadas; o FasL (CD95L) expresso nas células T CD4⁺, T CD8⁺ e células NK após estimulação e o TRAIL associado à citotoxicidade mediada por células T, NK e monócitos o qual pode interagir com TRAIL-R1 (DR4) e TRAIL-R2 (DR5) induzindo apoptose ou interagir com TRAIL-R3 (DCR1) e TRAIL-R4 (DCR2) levando a um efeito antagonista da apoptose (OPFERMAN e KORSMEYER, 2003; AGGARWAL, 2003)

Já os eventos sinalizadores intrínsecos ou do tipo II, estão diretamente relacionados com a ativação mitocondrial que é causada por exposições físicas (radiação ionizante, hipertermia) e tóxicas (peróxido de hidrogênio); radicais livres; mecanismos imunologicamente relevantes como à morte mediada por linfócitos T

citotóxicos (CD8⁺) com a polarização de grânulos citotóxicos (granzima-perforina) e stress oxidativo (OPFERMAN e KORSMEYER, 2003; HOCKENBERY, 1995).

Após a indução da apoptose ao menos duas vias sinalizadoras podem ser desencadeadas através de seus domínios intracelulares (Anexo A). A primeira via envolve a cascata do domínio de morte (DD) que se comunica por meio de caspases e a segunda inclui a ativação de membros da família de oncogenes Bcl-2 (PHILCHENKOV, 2004).

As caspases possuem função iniciadoras e efetoras na apoptose e são pertencentes a um grupo de proteínas classificadas como iniciadoras e/ou efetoras da apoptose (Anexo B) que clivam proteínas no terminal C de resíduos de ácido aspártico e são sintetizadas como zimogênios que requerem clivagem proteolítica para gerar subunidade ativa, que é conduzida por outras caspases, representando o maior repertório na sinalização da apoptose (PHILCHENKOV, 2004; KOLENKO *et al.*, 1999).

Bcl-2 é uma família de proteínas formada por membros pró-apoptóticos (Bax, Bak, Bcl-xs, Bok/Mtd, Bad, Nbk/Bik, Bid, Bim, Hrk, Blk e BNIP3) e anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1, A-1/Bfl-1) que regulam, dentre outras funções, o efluxo de citocromo c da mitocôndria para o citossol (ARAVIND *et al.*, 1999). Uma característica acentuada de Bcl-2 e os demais membros anti-apoptóticos é sua capacidade de promover proteção contra uma variedade de estímulos de morte, como o dano no DNA, inibição metabólica, expressão oncogênica e tratamento com glicocorticóides, podendo ainda, proteger da morte celular induzida por Fas (CD95) em alguns tipos celulares (OPFERMAN e KORSMEYER, 2003; RATHMELL e THOMPSON, 1999).

1.3.1 Apoptose na Infecção por HTLV-I

A apoptose pode ser iniciada por uma série de fatores, incluindo as infecções virais, onde se apresenta como um mecanismo de defesa do organismo para prevenir a propagação do vírus (OPFERMAN e KORSMEYER, 2003; RATHMELL e THOMPSON, 1999) e pode ser considerada como uma resposta imune inata para limitar a propagação e a expressão de proteínas virais as quais bloqueiam a resposta de morte; todavia, apoptose também pode facilitar a disseminação do vírus (EVERETT e MCFADDEN, 1999). Inúmeros vírus têm desenvolvido mecanismos para interferir na regulação normal da apoptose em células infectadas, dentre eles se encontra o HTLV-I que não é aparentemente capaz de induzir morte celular programada em células infectadas, o contrário do que ocorre com infecção pelo vírus HIV (BADLEY, 2000).

Linhagens de células T infectadas com HTLV-I se mostram parcialmente resistentes a vários mecanismos indutores de apoptose (BRAUWEILER *et al.*, 1997) e a ativação de NF- κ B via Tax em células infectadas (KAWAKAMI *et al.*, 1999; SUN e BALLARD, 1999) e uma expressão elevada de Bcl-xL, também via Tax, em células transfectadas (NAKASHIMA *et al.*, 2003) pode tornar estas células resistentes a diversos mecanismos indutores de apoptose. Por outro lado, linhagens de células transfectadas com Tax mostram ambos os efeitos pró e anti-apoptóticos a depender do estímulo empregado. Em algumas linhagens celulares, a Tax é capaz de induzir apoptose (NICOT e HARROD, 2000; CHEN *et al.*, 1997) e em outras possui um efeito anti-apoptótico (SAGGIORO *et al.*, 2001; TSUKAHARA *et al.*, 1999; KISHI *et al.*, 1997). Todavia, já está bem descrito que o vírus por si só é aparentemente anti-apoptótico (HAMASAKI *et al.*, 2001; FURUKAWA *et al.*, 2001).

A proteína Tax é capaz de desregular vários processos celulares influenciando a vida e a morte celular (JEANG *et al.*, 2004), a proliferação celular (YOSHIDA, 2001) ou indução de apoptose via bloqueio do reparo de DNA e segregação cromossômica (*apud* MARRIOTT *et al.*, 2002) ou ainda via stress oxidativo e dano direto ao DNA (CHLICHLIA *et al.*, 2002). Em geral, a Tax pode ativar (NG *et al.*, 2001) e/ou se ligar a vários genes celulares levando a uma transformação celular ou a uma leucemização (WU *et al.*, 2004).

As vias pelas quais a Tax transativa esses genes é composta pela ativação de pelo menos três regiões regulatórias de promotor: 1. A seqüência CRE (elementos responsivos do cAMP), à qual se ligam as proteínas CREB/ATF ou CREM; 2. O sítio de ligação para membros da família NF- κ B (fator de transcrição nuclear do gene κ nas células B); 3. A seqüência SRE (elementos responsivos ao soro) que se liga aos SRF. Estas seqüências ativadas podem levar a célula ao crescimento sem a necessidade de sinais extracelulares (SUZUKI *et al.*, 1993; ZHAO e GIAM, 1992).

O domínio transcricional CREB/ATF se mostrou importante para proteger as células da apoptose uma vez que foi capaz de inibir a apoptose induzida pela superexpressão do oncogene Bax (SAGGIORO *et al.*, 2003). Entretanto, a expressão de Tax induz a translocação de NF- κ B para o núcleo, com a redução do complexo I κ B α -NF- κ B, e mantém a ativação constitutiva de NF- κ B em células T infectadas (*apud* YOSHIDA, 2001; BÉRAUD e GREENE, 1996).

NF- κ B desenvolve um importante papel no desenvolvimento e regulação do sistema imune, nas respostas inflamatórias e na proliferação e morte celular e é considerado um fator primordial para a apoptose em diversas patologias, o qual possui efeitos pró e anti-apoptóticos (*apud* BALDWIN, 2001; *apud* AGGARWAL,

2000) como por exemplo na ATL onde membros da família do NF- κ B (p50, p65 e cRel) podem induzir a expressão de APO2L, em parte dependente de Tax, em pacientes resistentes a apoptose via APO2L (MORI *et al.*, 2005).

1.4 FATORES QUE PODEM INFLUENCIAR A APOPTOSE E A PROLIFERAÇÃO CELULAR NA INFECÇÃO POR HTLV-I

Considerando a resposta imune inflamatória e a proliferação espontânea exacerbada dos linfócitos T nos indivíduos infectados por HTLV-I, bem como a modulação da apoptose nesses indivíduos, vem sendo avaliado, atualmente, o possível papel de algumas moléculas que seriam capazes de interferir com esta ativação e morte celular para proporcionar um melhor entendimento dos mecanismos de ação viral e vias moleculares envolvidas nesta infecção.

1.4.1 O papel dos Interferons do Tipo I

Os interferons possuem uma habilidade para interferir com a replicação viral e diferenciação celular e funcionam como imunomodulatórios, anti-proliferativos e anti-angiogênicos assim como participam da indução de genes pró-apoptóticos (BORDEN *et al.*, 2000).

A ação anti-proliferativa e pró-apoptótica nas células T está associada a uma variedade de alterações moleculares, incluindo aumento em inibidores de ciclina

kinases e moléculas pró-apoptóticas (FAS/FASL, p53, BAX, BAK), bem como a ativação de pró-caspases 3 e 8 (CHAWLA-SAKAR *et al.*, 2003).

Indução de morte celular ou apoptose não foi inicialmente considerada uma ação dos IFNs todavia, os IFN- α e IFN- β tem se mostrado indutores de alterações morfológicas características das células apoptóticas e estas alterações mostraram-se vinculadas ao envolvimento da sinalização FADD/caspase 8, ativação de caspases, liberação de citocromo c da mitocôndria, destruição do potencial mitocondrial e mudanças na simetria da membrana plasmática e fragmentação do DNA (CHAWLA-SAKAR *et al.*, 2001; MORRISON *et al.*, 2001; THYRELL *et al.*, 2002).

De acordo com os efeitos pleiotrópicos dos IFN do tipo I no sistema imune, desde 1995, os IFN- α e IFN- β vêm sendo gradativamente introduzidos na clínica, com ação combinada com outras drogas como arsênico ou AZT em indivíduos infectados, no entanto, o mecanismo de ação desses IFN ainda precisa ser elucidado nestas patologias.

1.4.2 O papel da NO sintase induzível (iNOs)

A iNOS é uma enzima induzida pelos interferons do tipo I e II, principalmente os IFN- γ e IFN- β , que catalisa a síntese de óxido nítrico (NO) e é conhecida como uma molécula envolvida em processos inflamatórios e defesa antimicrobiana em resposta a estímulos mitogênicos ou antigênicos (ALDERTON *et al.*, 2001; SCIORATI *et al.*, 1999; BOEHM *et al.*, 1997).

Glockzin e colaboradores, em 1999, sugeriram que o óxido nítrico pode afetar a atividade dos proteossomos devido à acumulação de p53 e indução de apoptose

por macrófagos, tratados com inibidores específicos de proteossomos e as subsequentes exposições de células a S-nitrosoglutathione e estimulação de NO endógeno produzidos por tratamento LPS/IFN- γ resultam na inibição da atividade de proteossomos e indução de apoptose.

Por outro lado, o NO também é capaz de inativar caspases por meio da oxidação e S-nitrosilação de cisteína ativa, bloqueando o processo apoptótico, além de modular os membros da família Bcl-2 que controlam a permeabilidade mitocondrial, indução das *heat shock protein* (HSP 70) e interação com a via das ceramidas (KOLB, 2000).

Portanto, dependendo da sua concentração, atividade e tipo celular, o óxido nítrico pode possuir diversos efeitos em relação a apoptose, podendo ser pró ou anti-apoptótico. Seus efeitos são observados quando esta molécula estimula a expressão de enzimas e fatores de transcrição envolvidos no reparo de DNA e modulação da apoptose assim como genes tumorais (p53), transativando a expressão dos genes pró-apoptóticos (Bax e inibidores cdk) diminuindo a expressão do Bcl-2 (anti-apoptótico).

Nas patologias associadas ao HTLV-I tem sido sugerido que o NO possa ter uma ação anti-apoptótica (SONOKI *et al.*, 1999) e mecanismos que possam bloquear seus mecanismos de ação poderiam ser propostos para a utilização na clínica.

2 OBJETIVOS

GERAL

Investigar os mecanismos moleculares que participam na ativação celular, na proliferação e na apoptose, espontânea ou induzida, utilizando células mononucleares de indivíduos infectados pelo HTLV-I.

ESPECÍFICOS

1. Estudar o efeito de IFN- α , - β (ex vivo e *in vitro*) na expressão de moléculas de ativação celular, na proliferação e na apoptose, em células mononucleares de indivíduos infectados pelo HTLV-I, e correlacionar com o estado clínico (HAM/TSP, ATL e assintomático).
2. Estudar o papel da iNOS na proliferação e na apoptose em células mononucleares de indivíduos infectados pelo HTLV-I, e correlacionar com o estado clínico (HAM/TSP, ATL e assintomático).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Participaram deste estudo indivíduos infectados pelo vírus HTLV-I, incluindo carreadores soropositivos assintomáticos (n=10), pacientes com HAM/TSP (n=25) e com ATL (n=31). Como controles sadios foram utilizados doadores normais (n=40), soronegativos pra HTLV-I, obtidos no hemocentro da Bahia (HEMOBA), localizado na cidade de Salvador.

3.1.1 Assintomáticos e Pacientes

Os indivíduos assintomáticos com sorologia positiva para HTLV-I foram selecionados no Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) e na Fundação de Neurologia e Neurocirurgia da Bahia (FNN). Em relação aos pacientes com HAM/TSP, todos foram recrutados na FNN (Anexo C); os pacientes com ATL foram selecionados de um grupo de pacientes acompanhados por Dra. Achiléa Bittencourt no HUPES (Anexo D). Os indivíduos que participaram do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo G), após explicação dos objetivos da pesquisa.

3.1.2 Doadores Normais

A inclusão dos indivíduos nesse grupo foi realizada de acordo com os critérios do HEMOBA. Após a coleta do material, o hemocentro se encarrega de realizar testes sorológicos para sífilis, chagas, hepatite B e C, HIV e HTLV-I e II.

3.2 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS

As células mononucleares foram isoladas e purificadas do sangue periférico por meio de um gradiente de Ficoll-Hypaque (Pharmacia) (BOYUM, 1968), cultivadas na concentração de 5×10^6 U/mL em suspensão com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*) (para as dosagens de nitrito) ou meio RPMI (desenvolvido em 1969 no *Roswell Park Memorial Institute*) (Gibco-BRL) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Hyclone), 1% de L-glutamina (2mM) e 50 μ g/mL de gentamicina. Estas células foram distribuídas em placas de 24 poços, cada poço contendo 0,5 mL de células e cultivadas por 72 horas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Alguns poços foram estimulados com 10 a 10³ U/mL de IFN- α e - β (Schering e Serono, respectivamente), 2mM de inibidor de iNOS (L-NMMA, 1400W), 0.2 μ g/mL de α -CD3 (Pharmingen/purificado, sem endotoxina e sem AZIDA) e 1 μ g/mL de α -Fas agonista e antagonista (Alexis biochemicals).

Após 72 horas de cultivo, as células foram coletadas e processadas para análise de citometria de fluxo, extração de RNA e citocentrifugação e os respectivos

sobrenadantes aliquotados para dosagem de nitrito e nitrato e para realização de Elisa para detecção de apoptose (*Roche Applied Science*).

3.3 QUANTIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os PBMC, após serem isoladas por intermédio de gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma e Pharmacia), foram ressuspensas em 200 μ L/poço de meio DMEM (Gibco-BRL) completo à densidade de 1x10⁶/mL e cultivados em placas de microtitulação fundo U (96 poços), por 4 dias à 37°C em 5% de CO₂ e 95% de umidade. Os PBMC foram estimulados ou não com IFN- α e - β , L-NMMA e α -CD3, dispostos em triplicatas. Após este período, foi adicionado à cultura ³H-timidina (0,5 μ Ci/200 μ L) e estas células permaneceram por mais 16 horas (*overnight*) à 37°C em 5% de CO₂ e 95% de umidade.

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

3.4 ESTUDO DO FENÓTIPO CELULAR - CITOMETRIA DE FLUXO

A análise fenotípica das células foi realizada em Sangue Total e em PBMC ex vivo e *in vitro* de doadores normais, pacientes com HAM/TSP, pacientes com ATL e indivíduos assintomáticos, por intermédio do Citômetro de Fluxo FACSort (*Becton Dickinson Immunocytometry systems, San Jose, CA*).

3.4.1 Marcação, Ex Vivo, de Moléculas de Superfície Celular

3.4.1.1 Células do Sangue Total

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

3.4.1.2 Células Mononucleares do Sangue Periférico

As células mononucleares, após separação por gradiente Ficoll-Hypaque, à densidade de 1×10^7 /mL foram ressuspensas em PBS/1%BSA/0,1% de azida + 25 % de plasma humano para bloquear as células a fim de reduzir as ligações inespecíficas dos anticorpos. Após 15 minutos de bloqueio, os anticorpos específicos (Anexo E) foram adicionados aos tubos e incubados no escuro por 30 minutos à 4°C, onde posteriormente se procedeu a duas lavagens com 150µL/tubo de PBS/1%BSA/0,1% de azida e centrifugações com 1000rpm/4°C/5 min. Depois das lavagens, as células foram fixadas com 200µL/tubo de PBS com formalina 1% e acondicionadas no escuro à 4°C até a data da aquisição.

3.4.2 Marcação, In Vitro, de Moléculas de Superfície Celular

As células mononucleares dos doadores foram destacadas (*scraper*) dos poços, após cultivo, e lavadas com PBS+1%BSA+0,1%AZIDA para serem bloqueadas com soro humano e então marcadas com anticorpos fluorescentes para quantificação de diversas moléculas de superfície. A marcação com anticorpos específicos permitiu a identificação de células T auxiliares (*helper*) e citotóxicas, monócitos, moléculas coestimulatórias e células apoptóticas, além de quantificar a expressão de proteínas reguladas pelos IFNs (Fas, FasL, HLA-DR, CD80 e CD86).

3.4.3 Aquisição e Análise de Dados

Para aquisição das amostras, primeiramente seguiu-se a definição dos parâmetros de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) e seleção de linfócitos na região denominada *gate*. Foram realizadas também compensações, ou seja, a aquisição de controles como células não marcadas e isotípicas para poder diferenciar a emissão de luz em comprimento de onda não definido da verdadeira presença de marcação com mais de um fluorocromo na mesma célula.

A porcentagem de células positivas e a intensidade mediana de fluorescência (MFI) foram calculadas após dedução do valor do controle (isotipo) com a utilização do software CELLQuest (versão 3.1F, BDIS – San Jose, CA).

3.5 FRAGMENTAÇÃO NUCLEAR - CITOCENTRIFUGAÇÃO

Os PBMC, *ex vivo* e após 72h de cultivo (estimulados ou não), foram fixados em lâminas de vidro com o auxílio da técnica de citocentrifugação (Centrífuga CT-2000/CIENTEC) e coradas com Hoechst 33258 ou Hematoxilina-Eosina (HE) para a caracterização morfológica da apoptose (fragmentação nuclear) e quantificação de células apoptóticas por microscopia de fluorescência e microscopia óptica, respectivamente.

3.6 ELISA PARA DETECÇÃO DE APOPTOSE

O sobrenadante após cultura por 72h foi coletado e aliquotado para a detecção de nucleossomas nas frações citoplasmáticas por intermédio da técnica de ELISA (*Roche Applied Science*, Cat. no. 1544675) segundo especificações do fabricante. Esta técnica baseia-se em um ensaio imunoenzimático quantitativo com a utilização de anticorpos monoclonais para marcação de DNA (anti-DNA-peroxidase) e histonas (anti-histone). Os resultados foram expressos em densidade ótica de acordo com a curva padrão (células Jurkat apoptóticas) e a leitura da reação, realizada em espectrofotômetro com filtro de 405 nm e analisada com o programa Softmax PRO 3.0.

3.7 DOSAGEM DE NITRATO E NITRITO

Alíquotas de 200 μ L de plasma ou soro foram dispensadas em microtubos de 1,5mL na presença de 20 μ L de cloreto de zinco 1M (Sigma, St Louis MO USA), para a desproteinização, e centrifugadas a 14 000rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Em seguida, o sobrenadante foi utilizado para a quantificação de nitrito por meio do método de Griess (DING ET al., 1988). A curva padrão (1-100 μ M) foi construída a partir de uma solução 0,1M de nitrito de sódio (NaNO₂) (Sigma, S-2252) diluída em RPMI, seguida de diluições seriadas (1:2), em placas de 96 poços. A

revelação foi realizada por intermédio da adição de reagentes à base de sulfanilamida (Sigma, S-9251) a 1% em 30% de ácido acético e N-(1-naftil) etilenediamina (NEED) (Sigma, S-9125) a 0,1% em 60% de ácido acético, na proporção de 1:2. A leitura foi feita em espectrofotômetro (leitor de ELISA- Emax *microplate reader* / *molecular Devices, Sunnyvale, Calif*) no comprimento de onda 570 nm.

Para determinação dos níveis de nitrito e nitrato, 100 μ L da solução de Vanádio III (solução 1:1 de vanádio 0,400gramas/50mL de HCl 0,1N) foi adicionado a cada poço e a placa, devidamente coberta com papel alumínio, foi incubada por 90 minutos a 37°C em estufa de CO₂ com 5% de umidade. Após incubação, a placa foi novamente lida em espectrofotômetro e os dados analisados no *software* Softmax PRO 3.0. Metodologia adaptada do protocolo original descrito por Miranda e colaboradores (2001).

3.8 ANÁLISE DE DADOS

A análise de dados e elaboração dos gráficos deste estudo foram realizadas utilizando o programa GraphPad - Prism 3.0 (*GraphPad software, San Diego, CA*). O teste *t* não pareado foi utilizado para comparação entre pacientes e controles (com correção de Welch quando necessário) e o teste *t* pareado foi usado para comparar amostras estimuladas com não estimuladas *in vitro*. O teste de Pearson foi aplicado para correlacionar parâmetros imunológicos e/ou clínicos. Para os demais dados (teste de Kolmogorov-Smirnov), foram utilizados os testes não-paramétricos correspondentes (Mann-Whitney, Wilcoxon e Spearman).

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DOS IFN- α e IFN- β NA PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE EM INDIVÍDUOS INFECTADOS POR HTLV-I.

Considerando a resposta imune inflamatória e a proliferação espontânea exacerbada dos linfócitos T nas patologias associadas ao HTLV-I e sabendo-se que a ação dos interferons- α e - β está associada a uma variedade de alterações moleculares, incluindo aumento em inibidores de ciclina kinases e moléculas pró-apoptóticas (Fas/FasL, p53, Bax, Bak), bem como a ativação de pró-caspases 3 e 8 e regulação da expressão de MHC de classe I e II em todos os tipos celulares, buscou-se inicialmente avaliar a expressão do HLA-DR, Fas/FasL e CD80/86, moléculas reguladas pelos IFNs do tipo I e do tipo II, em PBMC de pacientes com HAM/TSP, com ATL e em indivíduos assintomáticos.

4.1.1 Expressão Ex Vivo das Moléculas Reguladas pelos Interferons do Tipo I

4.1.1.1 Avaliação da Expressão de HLA-DR

Pode-se avaliar a expressão ex vivo de HLA-DR em pacientes com ATL, HAM/TSP e em indivíduos assintomáticos comparando-os aos doadores normais, por citometria de fluxo.

Na figura 1 pode-se observar maior variância entre os pacientes, tanto em ATL (F-test, $p < 0,0001$) quanto em HAM/TSP (F-test, $p = 0,007$) tornando necessária uma análise estatística com correção de Welch (teste t de *Student* não pareado, com *Welch's correction*).

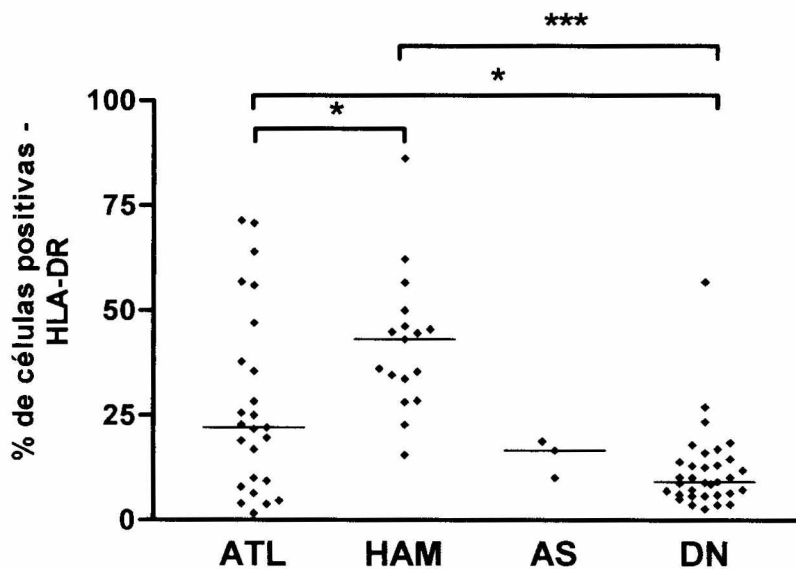


Figura 1. Expressão ex vivo de HLA-DR em PBMC de indivíduos infectados por HTLV-I. Porcentagem de células positivas após marcação de moléculas de superfície e quantificação por citometria de fluxo em pacientes com Leucemia de células T no adulto (ATL) (n=15), pacientes com Mielopatia associada ao HTLV-I (HAM) (n=17), soropositivos assintomáticos (AS) (n=3) e doadores normais (DN) (n=28).

A expressão de HLA-DR apresentou uma significância estatística maior em pacientes com HAM/TSP ($p < 0,0001$) do que em pacientes com ATL ($p = 0,0023$),

quando se comparou esses grupos com doadores normais. Entretanto, na HAM/TSP o aumento estatisticamente significativo foi observado também quando se comparou com os pacientes com ATL ($p=0,025$), refletindo uma maior ativação linfocitária nesses pacientes.

4.1.1.2 Expressão Ex Vivo de Fas e FasL

Na figura 2 observa-se um aumento significativo da expressão de Fas (CD95) em pacientes com ATL ($p=0,0021$), HAM/TSP ($p<0,0001$) e em assintomáticos ($p<0,0001$), quando se compara com os doadores normais.

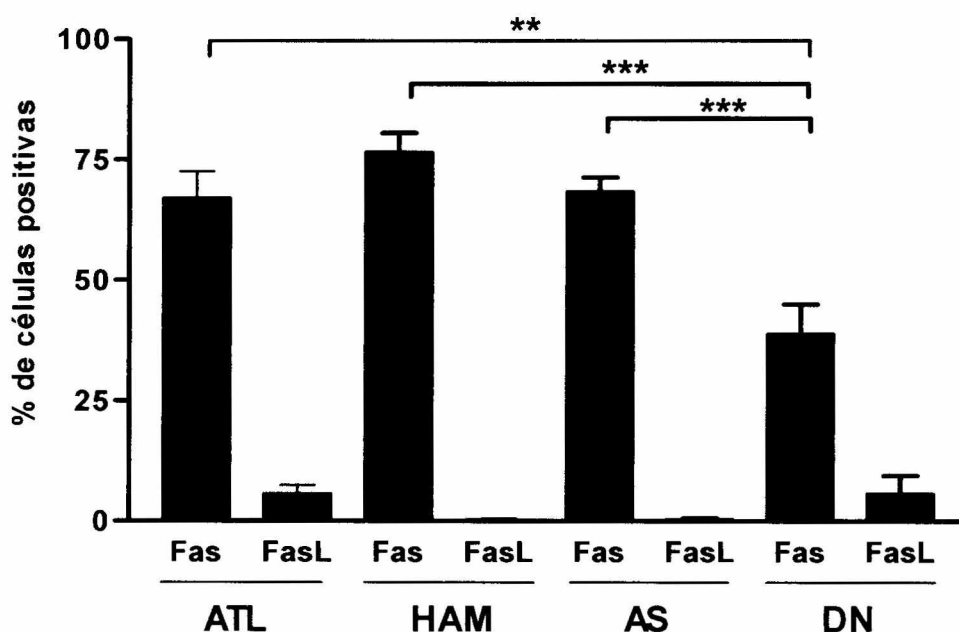


Figura 2. Expressão ex vivo de Fas e FasL em PBMC de indivíduos infectados por HTLV-I. Porcentagem de células positivas após marcação de moléculas superfície e quantificação por citometria de fluxo em ATL (Fas n=12, FasL n=12), em HAM/TSP (Fas n=19, FasL n=4), em assintomáticos (Fas n=30, FasL n=8) e doadores normais (Fas n=15, FasL n=7).

Porém, a expressão de Fas não é significativamente diferente entre HAM e ASS ($p=0,092$) e entre ATL e AS ($p=0,82$), indicando que a própria infecção pelo HTLV-I seria responsável pelo aumento de Fas, independente da patologia

associada. Entretanto, o FasL se mostrou com baixa expressão nos quatro grupos avaliados, sem significância estatística.

4.1.1.3 Correlação da Expressão Ex Vivo de FAS (CD95) e HLA-DR com Apresentação Clínica em Pacientes com HAM/TSP

Para verificar se a expressão elevada de CD95 teria alguma associação com dados clínicos e demográficos dos pacientes com mielopatia, foi investigada a possível correlação da expressão de Fas com idade, gênero, forma de infecção, tempo de doença e as escalas de Osame e de Kurtzke (Tabela 4, em Anexo). Apenas o tempo de doença exibiu correlação negativa com a expressão de Fas ($p=0,043$ $r = -0,54$) (Figura 3).

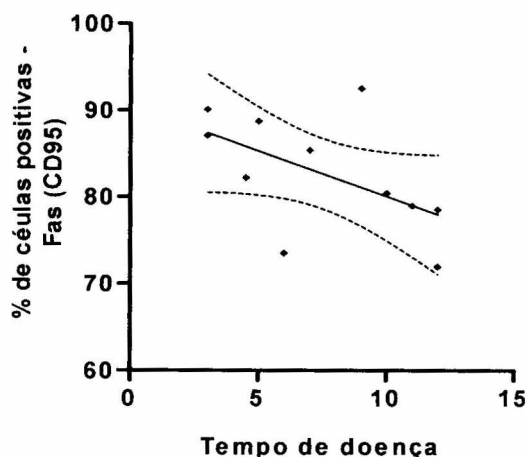


Figura 3. Correlação da expressão ex vivo de CD95 com o tempo de doença em pacientes com HAM/TSP. Porcentagem de células positivas para CD95 após quantificação por citometria de fluxo e correlacionadas com o tempo de doença ($n=11$).

Mesmo que tenha sido observada uma correlação positiva significativa ($p=0,016$ $r=0,63$) entre a expressão de Fas (CD95) e a expressão de HLA-DR (Figura 4), o HLADR não se correlaciona com tempo de doença e nem com outros

parâmetros clínicos sugerindo que a capacidade pró-apoptótica, mas não a ativação celular, dos linfócitos diminui ao longo da evolução da doença.

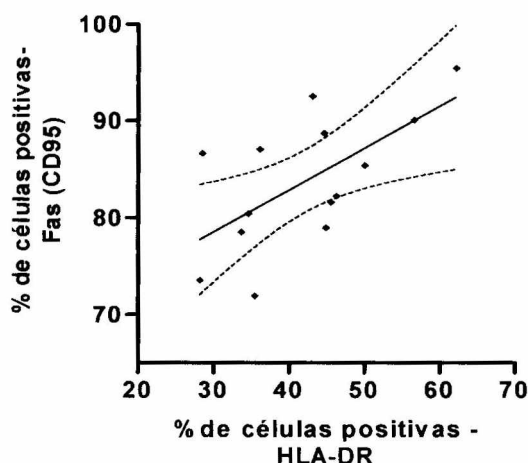


Figura 4. Correlação da expressão ex vivo de HLA-DR com a expressão de CD95 em PBMC de pacientes com HAM/TSP. Porcentagem de células positivas para HLA-DR após quantificação por citometria de fluxo, correlacionadas com a Porcentagem de células positivas para CD95 após quantificação por citometria de fluxo (n=14).

4.1.1.4 Expressão Ex Vivo das Moléculas Coestimulatórias CD80 (B7-1) e CD86 (B7-2) em Pacientes com HAM/TSP

Os resultados demonstram uma expressão elevada de CD80 e CD86 tanto em linfócitos T (CD19⁻), quanto em células B (CD19⁺) nos pacientes HAM/TSP, quando comparados aos doadores normais. Em linfócitos T, a expressão de CD80 apresentou uma significância estatística menor ($p=0,031$) que o CD86 ($p=0,0006$) em linfócitos B o CD80 apresentou significância estatística maior ($p=0,0052$) que o CD86 ($p=0,029$) (Figura 5).

A expressão de CD80 nas células B foi significativamente maior em mulheres ($p=0,0087$) do que em homens (dados não mostrados), semelhante ao observado na esclerose múltipla, de acordo com uma maior predisposição à doença nos indivíduos do sexo feminino.

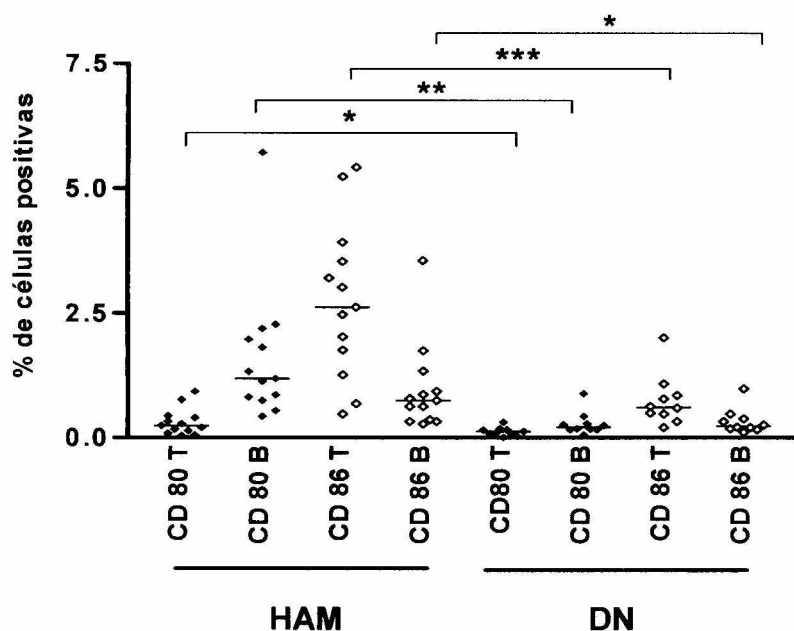


Figura 5. Expressão ex vivo de CD80 e CD86 em PBMC de pacientes com HAM/TSP. Porcentagem de células positivas para CD80 e CD86 após quantificação por citometria de fluxo em HAM/TSP (CD80 n=13, CD86 n= 13) e em doadores normais (CD80 n=10, CD86 n=10).

4.1.1.5 Correlação entre Apresentação Clínica e Expressão de CD80 e CD86 Ex Vivo

Para avaliar se a expressão destas moléculas coestimulatórias estaria de alguma forma associada com os dados clínicos e demográficos dos pacientes com HAM/TSP, foi investigada a possível correlação com idade, gênero, forma de infecção, tempo de doença e as escalas de Osame e de Kurtzke (Anexo D). Pudemos observar que o CD80 apresentou uma correlação positiva ($p=0,047$ $r=0,64$) com a escala de Kurtzke enquanto que o CD86 não apresentou correlação significativa, nos linfócitos totais.

Entretanto essa correlação positiva entre CD80 e escala de Kurtzke foi mais expressiva nas células B ($p=0,0083$ $r=0,75$) (Figura 6A), indicando que a expressão de CD80, preferencialmente nos linfócitos B, poderia estar associada com a

progressão da infecção e/ou uma piora clínica. Porém, a razão CD86/80 nas células B mostrou correlação negativa com a escala de Kurtzke ($p=0,052$ $r=-0,60$) (Figura 6B), indicando um possível efeito antagônico entre as duas moléculas, como demonstrado anteriormente na esclerose múltipla (GENÇ *et al.*, 1997).

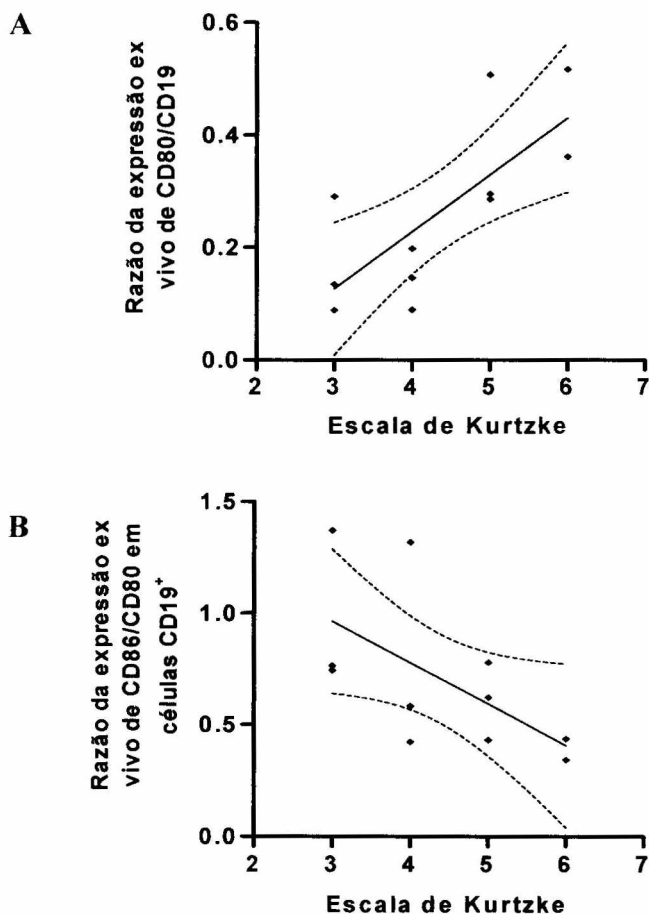


Figura 6. Correlação da escala de Kurtzke com a porcentagem de células B positivas ex vivo em PBMC de pacientes com HAM/TSP. Porcentagem de células positivas para CD80 após quantificação por citometria de fluxo (A) Razão de células (CD19⁺) positivas para CD80 (n=10) e porcentagem de células positivas para CD80/CD86 após quantificação por citometria de fluxo (B) razão CD86/CD80 (n=11) e correlacionadas com a escala de Kurtzke.

4.1.2 Expressão *In Vitro* das Moléculas Reguladas pelos Interferons do Tipo I

A expressão elevada de HLA-DR, Fas/FasL, e CD80/86 ex vivo e sua correlação com a apresentação clínica em indivíduos infectados, principalmente em

pacientes com HAM/TSP, sugere que os interferons tipo I e/ou II seriam expressos *in vivo* e provavelmente estariam influenciando a evolução clínica nestes pacientes. Portanto, procuramos estudar o efeito *in vitro* dos interferons- α e - β em PBMC de indivíduos infectados por HTLV-I.

As doses de IFN- α e IFN- β utilizadas foram estabelecidas em 1000 U.I./mL, a partir de experimentos de curva dose avaliando o efeito estimulatório *versus* citóxicos dos mesmos em doadores normais como observado na figura 7 e de acordo com dados já publicados (VAN WEYENBERGH *et al.*, 1998).

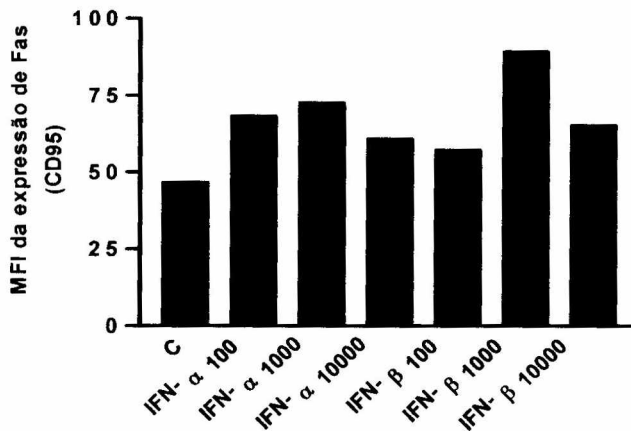


Figura 7. Curva dose do efeito do IFN- α e IFN- β na expressão de Fas (CD95) em PBMC de doadores normais. MFI (intensidade mediana de fluorescência) de células positivas para CD95 após quantificação por citometria de fluxo em PBMC de doadores normais cultivados por 72 horas na presença de 100 U.I./mL, 1000 U.I./mL e 10000 U.I./mL doses de IFN- α e IFN- β .

4.1.2.1 Avaliação dos Efeitos do IFN- α e IFN- β na Expressão de Moléculas Coestimulatórias em Pacientes com HAM/TSP

Sabendo-se que os interferons do tipo-I vêm sendo utilizados no tratamento das patologias associadas ao HTLV-I apresentando uma melhora clínica, buscou-se avaliar se eles estariam de alguma forma influenciando a expressão das moléculas coestimulatórias, visto que estas são induzidas pelos IFN do tipo I e II e poderiam funcionar como marcadores biológicos em pacientes HAM/TSP (Figura 6).

A possível atividade dos IFN foi investigada por meio de citometria de fluxo para CD80 e CD86, após cultura *in vitro* com IFN- α e IFN- β onde se pode observar que o IFN- β , mas não o IFN- α foi capaz de aumentar o MFI da expressão de CD86 (Figura 8). Entretanto, em relação ao CD80 não se observou esse aumento, o que reforça a hipótese de que o IFN- β poderia estar ligado ao aumento *in vivo* do CD86.

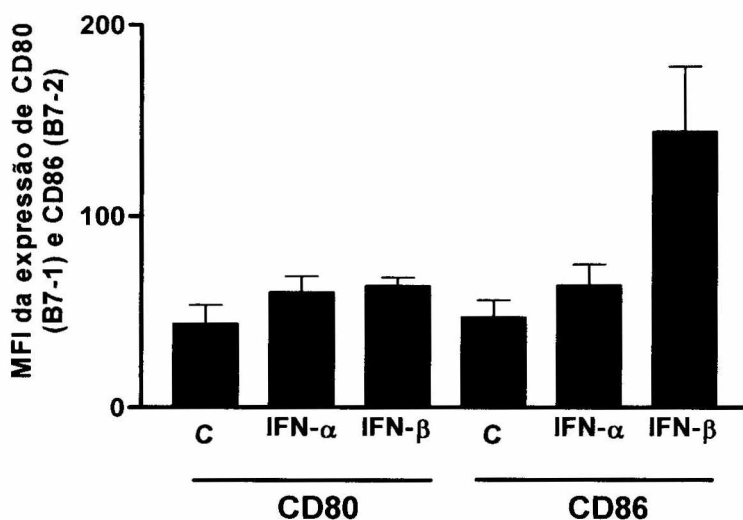
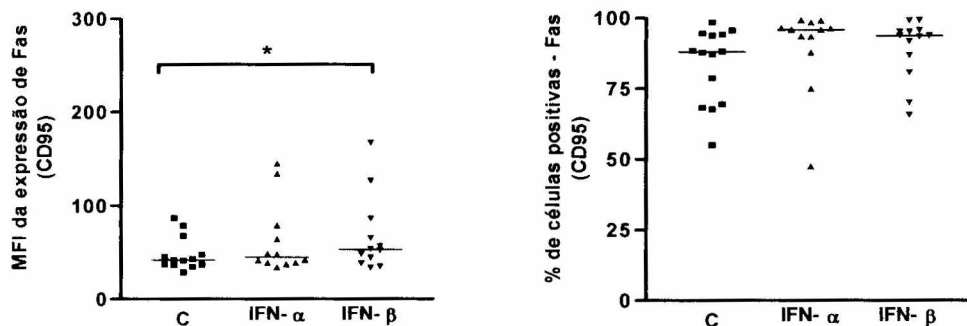


Figura 8. Expressão *in vitro* de CD80 e CD86 em PBMC de pacientes com HAM/TSP. Porcentagem (A) e MFI (B) de células positivas para CD80 e CD86 após quantificação por citometria de fluxo (CD80 n=2 e CD86 n=2) em PBMC de pacientes HAM/TSP cultivados por 72 h na presença de 1000U.I./mL de IFN- α e 1000U.I./mL de IFN- β .

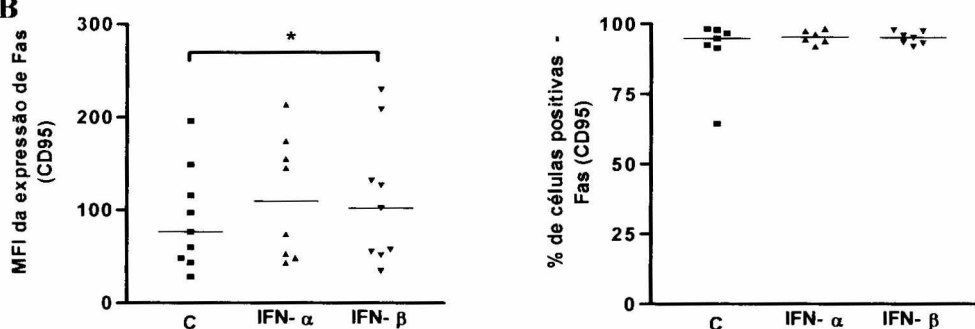
4.1.2.2 Avaliação, In Vitro, da Ação dos Interferons na Expressão de Fas (CD95) em Indivíduos Infectados por HTLV-I

Buscou-se avaliar a influência dos interferons tipo-I na expressão de Fas (CD95), por meio da análise por citometria de fluxo após o cultivo de PBMC estimulados com IFN- α e IFN- β por 72 horas. Pode-se verificar que em doadores normais tanto o IFN- α ($p=0,0077$ - MFI e $p=0,0022$ - % de células positivas) quanto o IFN- β ($0,0010$ - MFI e $p=0,0002$ - % de células positivas) foram capazes de aumentar significativamente a expressão de Fas (CD95) (Figura 9C).

A



B



C

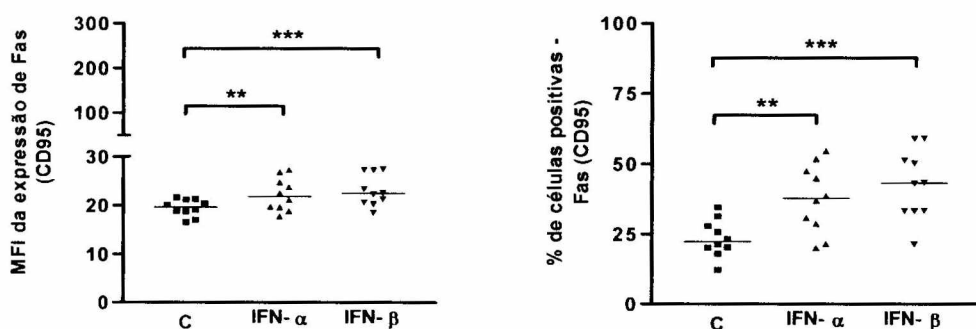


Figura 9. Expressão *in vitro* de CD95 em PBMC de indivíduos infectados por HTLV-I. Percentagem e MFI de células positivas para CD95 após quantificação por citometria de fluxo em PBMC (A) de pacientes com ATL (MFI – IFN- α n=12, IFN- β n=12 /% de células positivas- IFN- α n=14, IFN- β n=16) (B) HAM/TSP (MFI – IFN- α n=8, IFN- β n=9 /% de células positivas- IFN- α n=6, IFN- β n=7) e (C).doador normal (MFI – IFN- α n=10, IFN- β n=10 /% de células positivas- IFN- α n=10, IFN- β n=10).

Entretanto, somente o IFN- β foi significativamente capaz de aumentar a expressão de Fas nos pacientes com HAM/TSP ($p=0,012$ - MFI e $p=0,37$ - % de células positivas) (Figura 9B). Nos pacientes com ATL ($p=0,031$ - MFI e $p=0,16$ - % de células positivas) (Figura 9A), em relação ao controle não estimulado, enquanto o IFN- α mostrou somente uma tendência em HAM/TSP ($p=0,088$ - MFI e $p=0,41$ - % de células positivas) e na ATL ($p=0,052$ - MFI e $p=0,16$ - % de células positivas).

4.1.3 Regulação *In Vitro* da Resposta Proliferativa pelos Interferons - α e - β em Indivíduos Infectados por HTLV-I

Visto que os IFN- α e - β são conhecidos por apresentar efeito antiproliferativo em células T e a proliferação exacerbada de linfócitos é um efeito direto da infecção viral, podendo ser o ponto chave nas patologias associadas ao HTLV-I (CERSETO *et al.*, 1996; WODARZ *et al.*, 1999; AZIMI *et al.*, 1999), buscou-se avaliar o papel dos interferons do tipo I na proliferação espontânea em pacientes com HAM/TSP, com ATL e em indivíduos assintomáticos.

Inicialmente, avaliou-se se a proliferação espontânea *in vitro* nos pacientes com HAM/TSP estaria refletindo a progressão clínica desses pacientes. Pode-se verificar que a proliferação espontânea se correlacionou positivamente com a escala de Kurtzke ($p=0,047$ $r=0,61$) (Figura 10), confirmando esse modelo *in vitro* como um bom modelo para testar o efeito dos IFN e outros fármacos, com suposta ação antiproliferativa, uma vez que a proliferação *in vitro* reflete o quadro clínico, como observado com os dados de correlação obtidos.

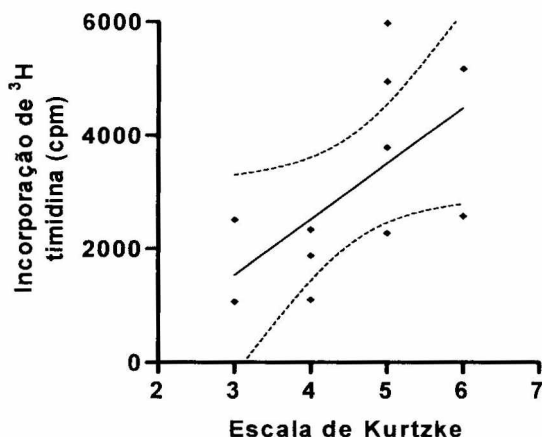


Figura 10. Correlação da escala de Kurtzke com a proliferação espontânea em pacientes com HAM/TSP. Valores da escala de Kurtzke correlacionados com a linfoproliferação quantificada por incorporação de ³H-timidina nos poços controle, sem estímulo, após cultura por 4 dias nos pacientes com HAM/TSP (n=11).

4.1.3.1 Efeito dos IFN- α e IFN- β na Proliferação Espontânea em Indivíduos Infectados por HTLV-I

Pode-se observar que o IFN- β se mostrou muito mais eficaz na indução de uma resposta antiproliferativa do que o IFN- α , visto que apresentou um marcante efeito anti-proliferativo na HAM/TSP ($p < 0,0001$), em pacientes com ATL ($p = 0,019$) e em doadores normais ($p = 0,029$). Todavia, embora o IFN- β não tenha alcançado significância estatística em assintomáticos ($p = 0,16$) o gráfico demonstra uma tendência à diminuição da proliferação, também nesses indivíduos.

O IFN- α apresentou um efeito antiproliferativo discreto, porém sem significância estatística em todos os grupos avaliados (HAM/TSP $p = 0,097$; ATL $p = 0,090$; AS $p = 0,25$ e DN $p = 0,34$) (Figura 11), demonstrando um efeito diferenciado do IFN- β .

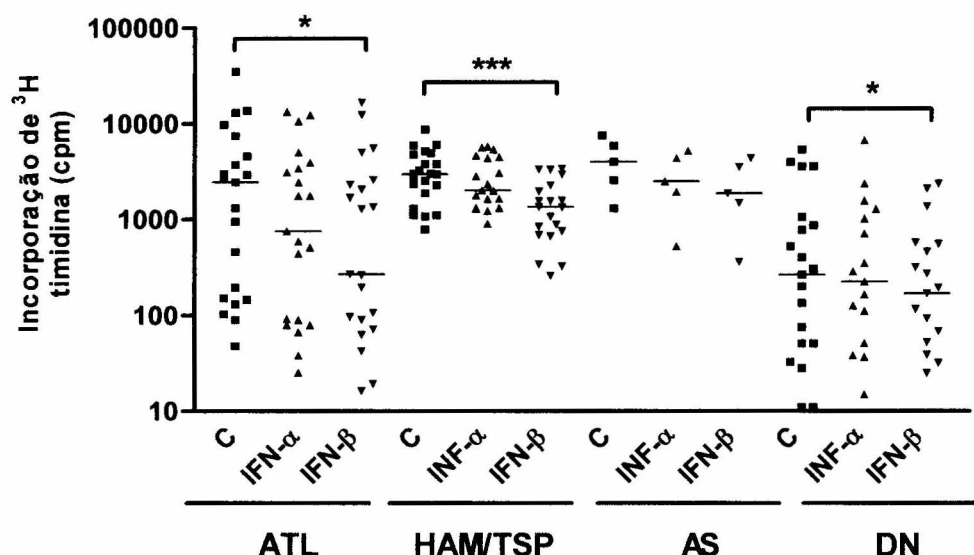


Figura 11. Linfoproliferação espontânea em indivíduos infectados por HTLV-I. Quantificação da linfoproliferação por meio da incorporação de ³H-timidina em PBMC de pacientes com ATL (n= 21), HAM/TSP (n= 23), soropositivos assintomáticos (n= 5) e doadores normais (n= 21) após cultura por 5 dias na presença de 1000U.I./mL de IFN- α - β .

4.1.3.2 Efeito do IFN- α e IFN- β na Proliferação Induzida por Anti-CD3 em Indivíduos

Infectados por HTLV-I

O *anti-CD3* é um mitógeno que pode promover um superestímulo nas células T atuando na proliferação e no desencadeamento da morte celular induzida por ativação (AICD), portanto buscou-se avaliar seu papel *in vitro* na resposta proliferativa em PBMC de pacientes com HAM/TSP, com ATL e em assintomáticos.

Na figura 12B, pode-se verificar uma diminuição da proliferação quando se cultiva estas células na presença de IFN- α (p=0,016) ou IFN- β (p=0,0019) em pacientes com HAM/TSP, entretanto, o estímulo com anti-CD3 sozinho (p=0,71) não foi capaz de influenciar a proliferação espontânea nesses indivíduos, uma vez que esta já se apresentava com níveis elevados (> 5000 cpm).

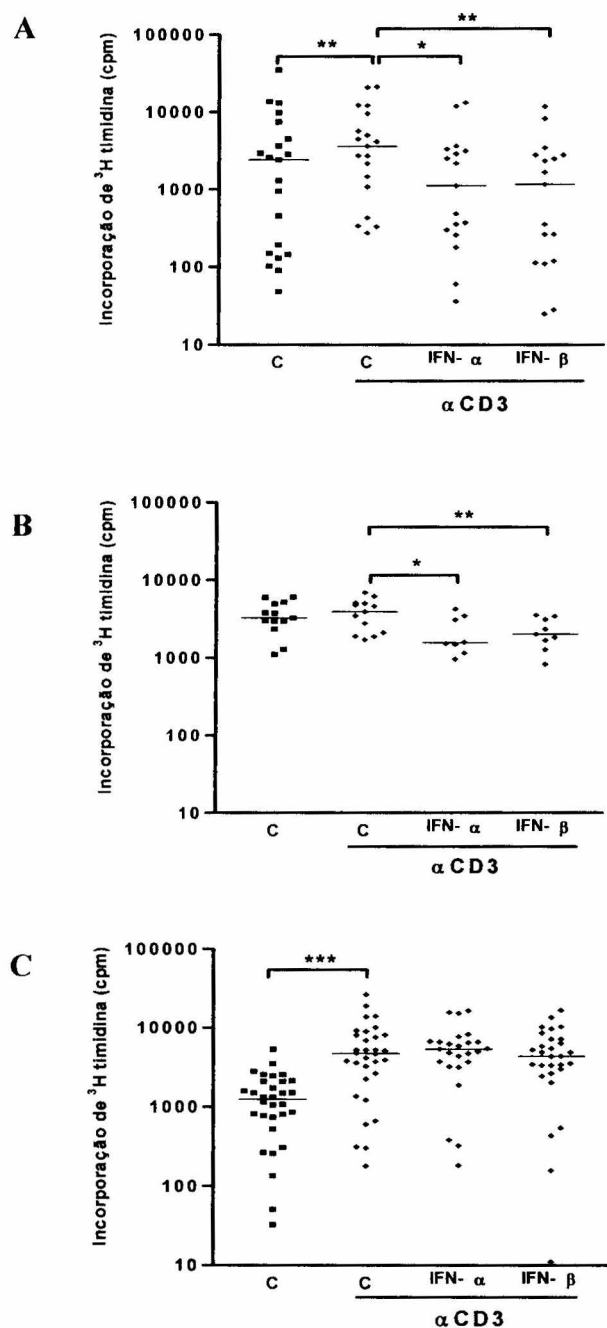


Figura 12. Linfoproliferação induzida por *anti*-CD3 em indivíduos infectados por HTLV-I. Quantificação da linfoproliferação por intermédio da incorporação de ^3H -timidina em PBMC de pacientes (A) ATL (*anti*-CD3 n=19, IFN- α n=17, IFN- β n=17), (B) HAM/TSP (*anti*-CD3 n=13, IFN- α n=8, IFN- β n=9) e (C) doadores normais (*anti*-CD3 n=32, IFN- α n=25, IFN- β n=29) após cultura por 5 dias na presença de 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de *anti*-CD3 e de 1000U.I./mL de IFN- α - β .

Em pacientes com ATL (Figura 12A), o *anti*-CD3 mostrou um significativo efeito pró-proliferativo ($p=0,0081$) embora exista uma maior variância nos níveis de proliferação espontânea neste grupo. Por outro lado, a co-estimulação com o IFN- α

($p=0,025$) e IFN- β ($p=0,0063$) mostrou um efeito anti-proliferativo marcante e embora o IFN- β tenha apresentado uma significância estatística maior, ambos os estímulos se mostraram antiproliferativos em pacientes com HAM/TSP e com ATL.

Em relação aos doadores normais (Figura 12C), o *anti-CD3* atua muito mais como um estímulo policlonal semelhante ao induzido pela infecção viral nos pacientes, o que justifica que o estímulo *anti-CD3* seria apenas estimulatório induzindo proliferação em doadores normais ($p<0,0001$), visto que os IFN- α ($p=0,57$) e IFN- β ($p=0,53$) não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao estímulo com anti-CD3.

4.1.4 Regulação *In Vitro* da Apoptose Espontânea pelos Interferons - α e - β em Indivíduos Infectados por HTLV-I

Como o IFN- β se mostrou eficaz na diminuição da linfoproliferação, buscou-se então avaliar a influência dos interferons na marcação com Anexina-V (associada à exposição da fosfatidilserina) e a ativação da caspase-3, que são eventos iniciais do processo apoptótico.

Por meio de análises por citometria de fluxo verificou-se que o IFN- β , mas não o IFN- α , aparentemente induziu um leve aumento na marcação de Anexina-V, quando comparado com controle sem estímulo, nos pacientes com HAM/TSP ($p=0,18$) (Figura 13B) e em doadores normais ($p=0,075$) (Figura 13C) e apresentou significância estatística somente nos pacientes com ATL ($p=0,018$) (Figura 13A), nos quais também pudemos observar um marcante aumento significativo da expressão da caspase-3 ativada (Figura 14).

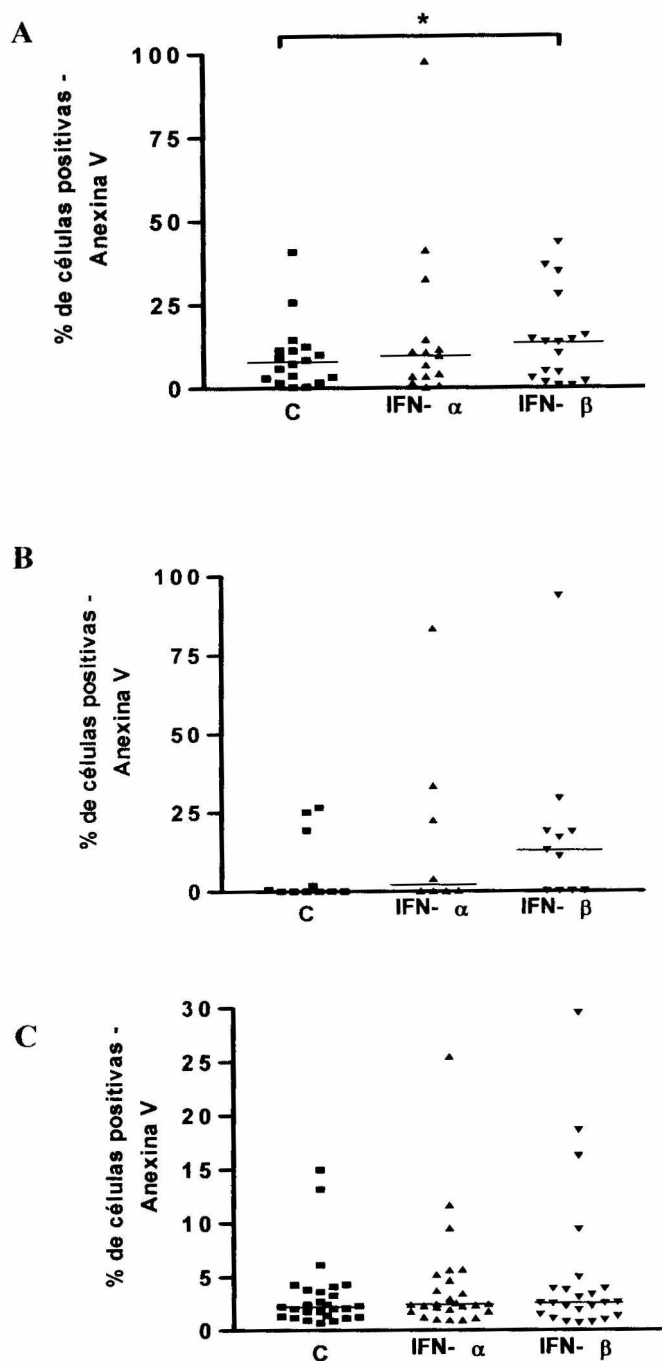


Figura 13. Marcação *in vitro* de Anexina-V em PBMC de indivíduos infectados por HTLV-I. Porcentagem de células positivas para anexina-V quantificadas por citometria de fluxo em PBMC de pacientes (A) com ATL (IFN- α n=15, IFN- β n=17) (B) com HAM/TSP (IFN- α n=7, IFN- β n=10), e doador normal (C) (IFN- α n=26, IFN- β n=25) após 72 h de cultura na presença de 1000 U.I./mL de IFN- α e IFN- β .

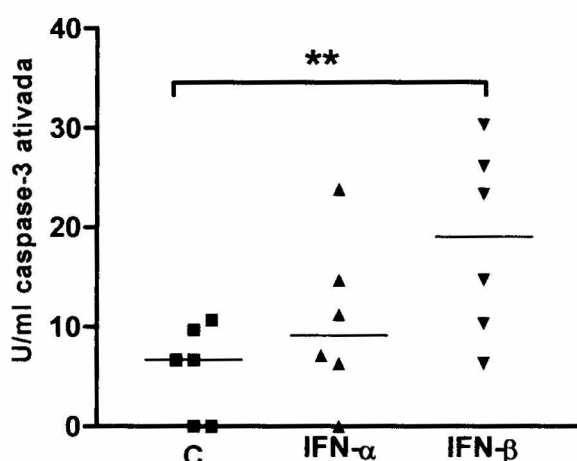


Figura 14. Marcação *in vitro* de Caspase-3 ativada em PBMC de pacientes com ATL. Unidades/mL de células positivas para caspase-3 quantificadas por citometria de fluxo (CBA- cytometric bead array) em PBMC após 72 h de cultura na presença de 1000 U.I./mL de IFN- α e IFN- β .

Para investigar se os interferons do tipo I teriam mesmo um papel pró-apoptótico, foram realizados ensaio imunoenzimático e caracterização e quantificação morfológica de células apoptóticas por microscopia ótica. Com o ELISA constatou-se que não houve significância estatística no aumento da morte celular nos pacientes com HAM/TSP, tanto com o IFN- β ($p=0,642$) quanto com o IFN- α ($p=0,345$) em relação ao controle não estimulado. Porém, pode-se observar que o IFN- β apresentou efeitos pró e anti-apoptóticos, revelando uma heterogeneidade entre os pacientes (dados não mostrados).

Quanto à fragmentação nuclear, observou-se que os IFN não foram capazes de induzir apoptose tanto em pacientes com ATL (IFN- α $p=0,33$ e IFN- β $p=0,55$) quanto em doadores normais (IFN- α $p=0,24$ e IFN- β $p=0,74$), demonstrando um efeito anti-proliferativo, mas não pró-apoptótico dos IFN. Entretanto, em doadores normais, os IFN apresentam respostas diferenciadas em relação à indução de apoptose, uma vez que se pode observar diferença entre o IFN- α e IFN- β ($p=0,059$) (Figura 15).

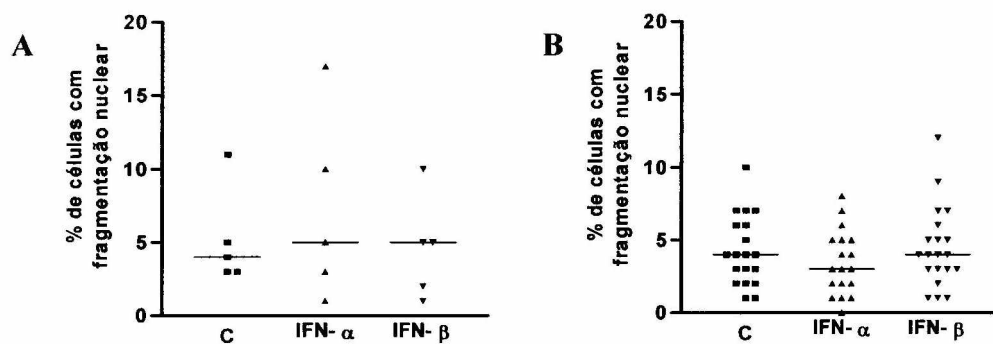


Figura 15. Quantificação de células apoptóticas por microscopia ótica em PBMC de pacientes com ATL e em doadores normais. Porcentagem de células apresentando fragmentação nuclear quantificadas por microscopia ótica após cultura com 1000 U.I./mL de IFN- α e IFN- β em (A) pacientes com ATL (IFN- α n=5, IFN- β n=5) e (B) doadores normais (IFN- α n=17, IFN- β n=19).

4.1.5 Regulação *In Vitro* da Apoptose Induzida pelos Interferons - α e - β em Indivíduos Infectados por HTLV-I

A estimulação com somente *anti*-CD3 além de interferir com a proliferação celular também é capaz de induzir a marcação com Anexina-V como demonstrado em comparação ao controle não estimulado, nos pacientes com HAM ($p=0,051$) (Figura 16B), ATL ($p=0,041$) (Figura 16A) e doadores normais ($p=0,0001$) (Figura 16C).

Todavia, tanto o IFN- α quanto o IFN- β não foram capazes de aumentar a marcação com Anexina-V em relação ao estímulo com *anti*-CD3 nos doadores normais (IFN- α $p=0,17$ e IFN- β $p=0,95$), na HAM/TSP (IFN- α $p=0,59$ e IFN- β $p=0,88$) e na ATL (IFN- α $p=0,36$ e IFN- β $p=0,34$) e também não apresentaram nenhum efeito na fragmentação nuclear nos pacientes avaliados (dados não mostrados).

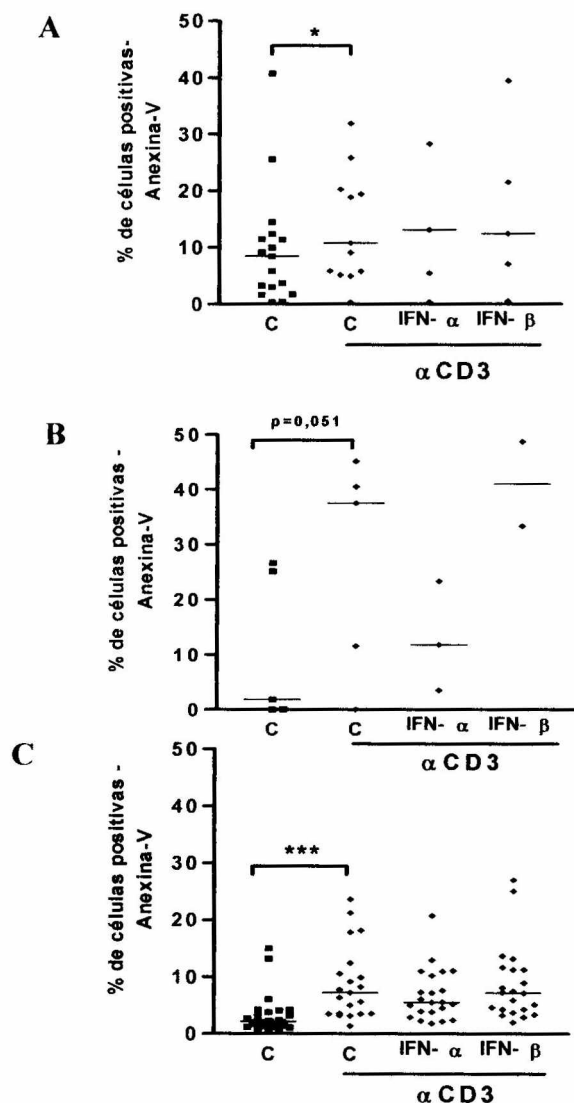


Figura 16. Marcação *in vitro* de Anexina-V após estimulação com *anti*-CD3 em PBMC de indivíduos infectados por HTLV-I. Porcentagem de células positivas para anexina-V quantificadas por citometria de fluxo em PBMC de pacientes (A) ATL (*anti*-CD3 n=13, IFN- α n=5, IFN- β n=5), (B) HAM/TSP (*anti*-CD3 n=5, IFN- α n=3, IFN- β n=2) e (C) doador normal (*anti*-CD3 n=21, IFN- α n=21, IFN- β n=21) após 72 h de cultura na presença de 0,2 μ g/mL de *anti*-CD3 e 1000 U.I./mL de IFN- α e IFN- β .

Em pacientes com ATL (P=0,0065) e em doadores normais (p=0,021) o estímulo com *anti*-CD3 foi eficiente no aumento da fragmentação nuclear, assim como se pode observar um aumento da apoptose quantificada por ELISA (p=0,057) nos pacientes com HAM/TSP (dados não mostrados), confirmando seu efeito pró-apoptótico.

O aumento da fragmentação nuclear observado nos pacientes com HAM/TSP foi positivamente correlacionado com a marcação com Anexina-V como observado na figura 17, demonstrando que a Anexina-V pode ser um marcador confiável de apoptose para o tratamento com o anti-CD3, mas não com os IFNs.

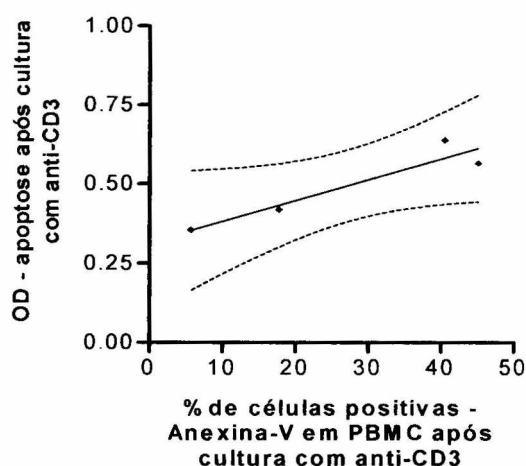


Figura 17. Correlação da quantificação de apoptose *in vitro* por ELISA e marcação *in vitro* de anexina-V após estímulo com *anti*-CD3 em PBMC de pacientes com HAM/TSP. Porcentagem de células positivas para anexina-V quantificadas por citometria de fluxo e correlacionadas com a densidade ótica calculada por espectrofotômetro após ensaio imunoenzimático quantitativo (ELISA) com a utilização de anticorpos monoclonais para marcação de DNA (anti-DNA-peroxidase) e histonas em sobrenadantes de pacientes HAM/TSP após cultura por 72 h com 0,2µg/mL de *anti*-CD3 e 1000 U.I./mL de IFN-α e IFN-β (anti-CD3 n=4, IFN-α n=1 e IFN-β n=3)

De acordo com as moléculas envolvidas no processo apoptótico, observou-se que, na HAM/TSP, tanto o IFN-α quanto o IFN-β não são capazes de induzir apoptose nos linfócitos T, entretanto a estimulação com *anti*-CD3 se mostrou pró-apoptótico e este efeito parece ser dependente de Fas (CD95) como verificado na figura 18, após a administração de α-Fas antagonista, onde houve uma redução da apoptose induzida por *anti*-CD3.

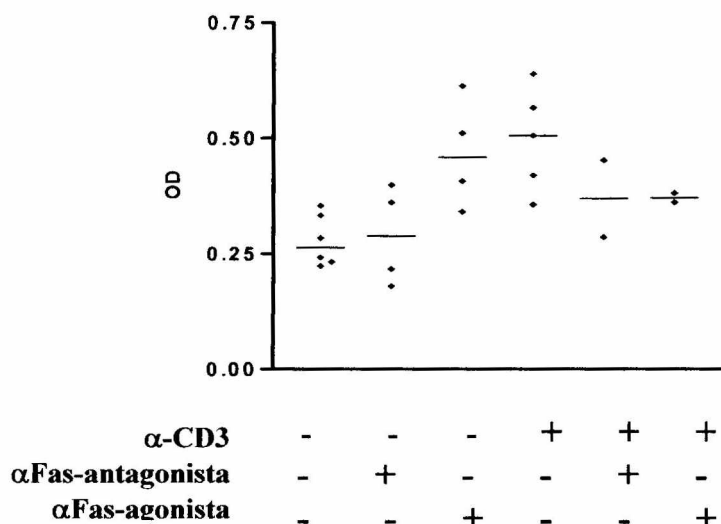


Figura 18. Quantificação de apoptose *in vitro* por ELISA, após estímulo com *anti*-CD3, α -Fas-antagonista e α -Fas-agonista em PBMC de pacientes com HAM/TSP. Densidade ótica calculada por espectrofotômetro após ensaio imunoenzimático quantitativo (ELISA) com a utilização de anticorpos monoclonais para marcação de DNA (anti-DNA-peroxidase) e histonas em sobrenadantes de pacientes HAM/TSP após cultura de PBMC por 72 h na presença de 0,2 μ g/mL de *anti*-CD3 e 1 μ g/mL de α -Fas agonista ou antagonista (*anti*-CD3 n=5, α -Fas antagonista n=2 e α -Fas agonista n=2).

4.1.6 Associação entre Ativação, Proliferação e Apoptose em Linfócitos T CD8⁺ e CD8⁻

Foram realizados dois experimentos com 10 doadores cada para verificar a acuidade das técnicas para detecção de apoptose e tentar esclarecer se as diferenças observadas entre as resposta proliferativa e apoptótica dos IFN- α e IFN- β estariam relacionados às populações de células TCD4⁺ e CD8⁺ nos indivíduos infectados, visto que Sibon e colaboradores (2006) observaram um aumento na expansão clonal e proliferação espontânea maior em linfócitos CD4⁺ infectados, enquanto que a infecção por HTLV-I estaria protegendo os linfócitos CD8⁺ da apoptose, o que poderia explicar porque a grande maioria de linfomas e leucemias associadas ao HTLV-I apresentam um fenótipo CD4⁺.

Pode-se observar inicialmente, que nos doadores normais não há diferenças nos níveis ex vivo de células T CD4⁺ (CD8⁻) e CD8⁺, em contraste com os pacientes com ATL ($p < 0,0001$) (Figura 19), nos quais a razão CD4/CD8 está significativamente aumentada (2,5/1). Observou-se também uma alta expressão de HLA-DR ($p = 0,0020$), Fas ($p = 0,18$), células TCD4⁺ ($p = 0,0095$), células TCD4⁺CD25⁺ ($p = 0,0012$) e células TCD8⁺CD25⁺ ($p = 0,084$) nos pacientes com ATL, quando comparado aos doadores normais. Entretanto, observou-se uma diminuição de células TCD8⁺ ($p = 0,026$) e de células CD56⁺ ($p = 0,0055$) nestes pacientes, sugerindo que as células citotóxicas estariam sendo eliminadas no processo leucêmico. Em contraste com os pacientes com HAM/TSP, as células B permanecem em níveis normais durante a patogênese de ATL.

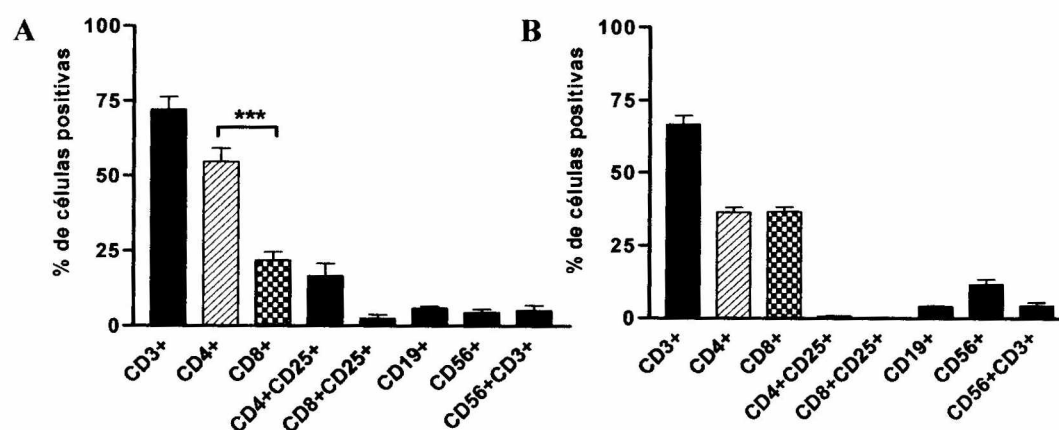


Figura 19. Expressão ex vivo de moléculas associadas com ativação celular e apoptose em PBMC de doadores normais e pacientes com ATL. Porcentagem de células positivas após quantificação por citometria de fluxo de (A) pacientes com ATL (CD3 n=29, CD4 n=28, CD8 n=29, CD19 n=25, CD25CD8 n=22, CD25CD4 n=24) e (B) doadores normais (CD3 n=10, todas as outras marcações n=20).

4.1.6.1 Efeito do IFN- α e IFN- β na expressão de Fas (CD95)

Em doadores normais tanto o IFN- α ($p = 0,0009$) quanto o IFN- β ($p = 0,0002$) foram capazes de aumentar a expressão de Fas, mesmo após o estímulo com anti-

CD3 (IFN- α $p=0,0016$ e IFN- β $p<0,0001$). Entretanto, pode-se observar que este aumento de Fas está muito mais associado ao fenótipo CD4⁺ nos linfócitos T.

Após cultivo *in vitro* houve maior aumento na expressão de CD95 nas células TCD8⁻, comparado com as células CD8⁺, estatisticamente significante em todos os estímulos avaliados (IFN- α $p<0,0001$; IFN- β $p<0,0001$; anti-CD3 $p=0,0003$; anti-CD3+IFN- α $p=0,0002$ e anti-CD3+IFN- β $p<0,0001$), como se pode verificar na figura 20.

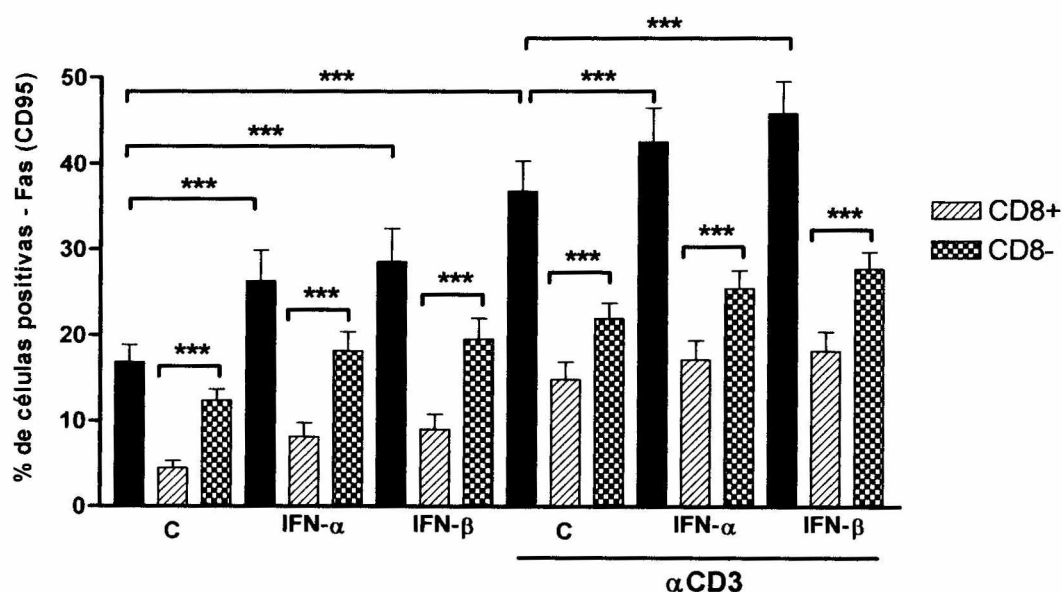


Figura 20. Expressão *in vitro* de CD95 em PBMC de doadores normais. Porcentagem de células positivas para CD95 após quantificação em células CD8⁺ e CD8⁻ por citometria de fluxo em PBMC de doadores normais (n=20) após 72 h de cultura na presença de 1000U/mL de IFN- α e 1000U/mL de IFN- β e 0,2 μ M de anti-CD3.

4.1.6.2 Efeito do IFN- α e IFN- β na Proliferação Espontânea e Induzida

O aumento de Fas pelos IFN- α e IFN- β poderia de alguma forma estar influenciando a proliferação e/ou a apoptose nos doadores normais, e pode-se observar que apenas nas amostras sem o estímulo com anti-CD3 os interferons

determinaram uma diminuição significativa na linfoproliferação (IFN- α $p=0,0023$ e IFN- β $p<0,0001$) (Figura 21).

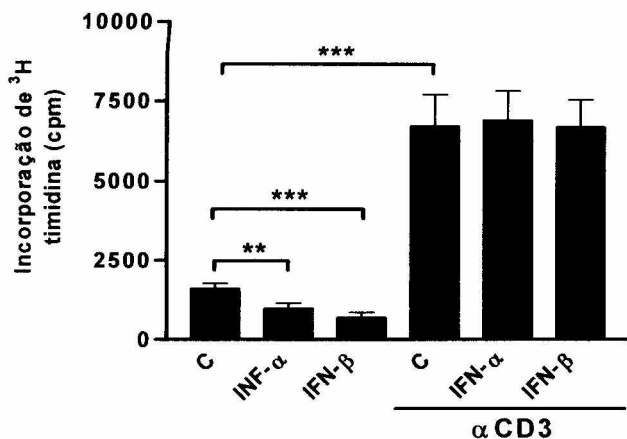


Figura 21. Linfoproliferação espontânea e induzida por *anti*-CD3 em PBMC de doadores normais. Quantificação da linfoproliferação por meio da incorporação de ^3H -timidina em PBMC de doadores normais ($n=20$) após cultura por 5 dias na presença de $0,2\mu\text{g/mL}$ de *anti*-CD3 e 1000U.I./mL de IFN- α - β .

Estes dados sugerem que na ausência de ativação mitogênica os interferons teriam um papel anti-proliferativo, podendo ser pró-apoptótico ou não, visto que, a proliferação induzida por IFN- α ($p=0,0032$; $r=0,71$) e IFN- β ($p<0,0001$; $r=0,84$) se correlacionou positivamente com o aumento de apoptose (fragmentação nuclear) (Figura 22).

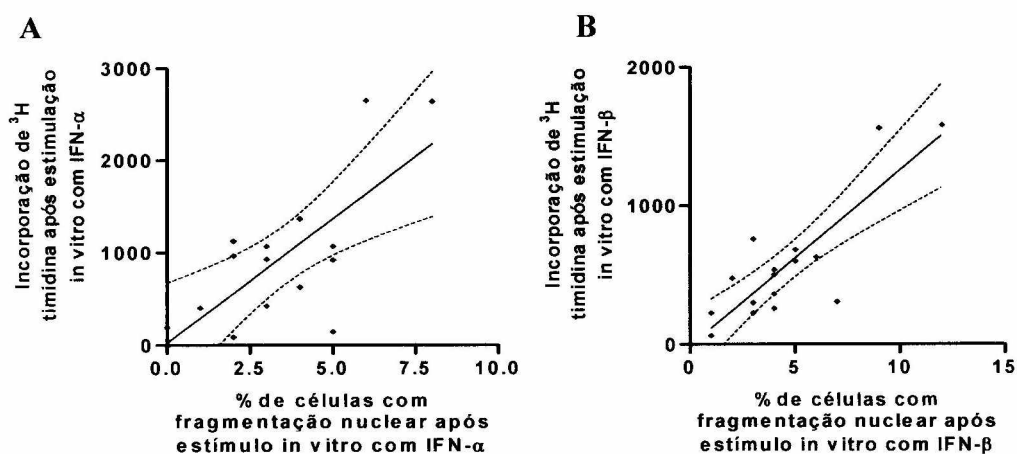


Figura 22. Correlação da quantificação de células apoptóticas por microscopia ótica e linfoproliferação espontânea em PBMC de pacientes com HAM/TSP. Porcentagem de células apresentando fragmentação nuclear quantificadas por microscopia ótica, correlacionadas com a linfoproliferação quantificada por meio da incorporação de ^3H -timidina em PBMC de doadores normais após cultura na presença de IFN- α ($n=15$) e IFN- β ($n=16$).

4.1.6.3 Efeito do IFN- α e IFN- β na Apoptose Espontânea e Induzida

Em relação à anexina-V observamos que os IFN- α e o IFN- β não foram capazes de aumentar a marcação com anexina-V espontânea (IFN- α $p=0,22$; IFN- β $p=0,14$) e induzida por anti-CD3 (IFN- α $p=0,29$; IFN- β $p=0,66$) (Figura 23). Por outro lado, pudemos observar que o próprio anti-CD3 apresentou um aumento estatisticamente significativo na marcação com anexina-V ($p=0,0003$) (Figura 23) e apoptose ($p=0,021$) (Figura 24).

Entretanto, após a estimulação com anti-CD3, embora não tenha apresentado efeito na marcação com anexina-V, o IFN- β mostrou um discreto aumento na fragmentação nuclear ($p=0,068$) (Figura 24).

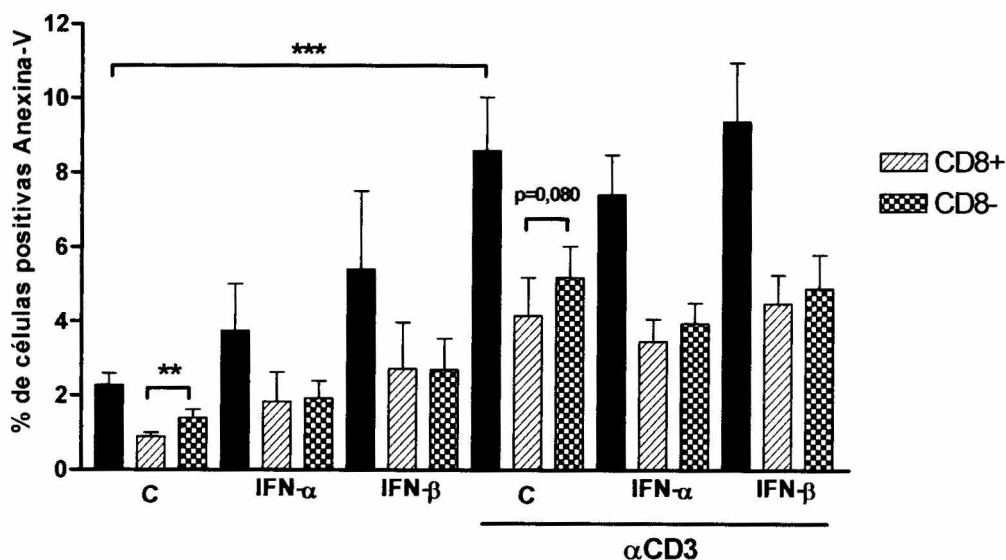


Figura 23. Marcação *in vitro* de Anexina-V após estimulação com *anti*-CD3 em PBMC de doadores normais. Porcentagem de células positivas para anexina-V quantificadas por citometria de fluxo em PBMC de doadores normais ($n=20$) após 72 h de cultura na presença de $0,2\mu\text{g/mL}$ de *anti*-CD3 e 1000 U.I./mL de IFN- α e IFN- β .

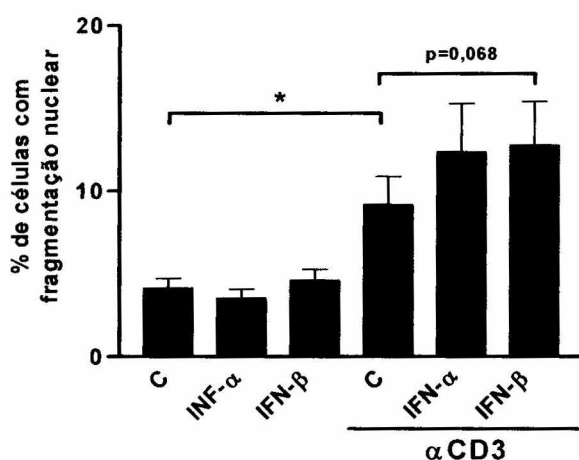


Figura 24. Quantificação de células apoptóticas, após estímulo com *anti-CD3*, por microscopia ótica em PBMC de doadores normais. Porcentagem de células apresentando fragmentação nuclear quantificadas por microscopia ótica após cultivo por 72 h na presença de 0,2µg/mL de *anti-CD3* e 1000U.I./mL de IFN-α e IFN-β (n=16).

De acordo com os linfócitos CD8⁻ e CD8⁺, observamos um aumento significativo de anexina-V nas células TCD8⁻ em relação às TCD8⁺ somente no controle não estimulado ($p=0,0086$) e após o estímulo com anti-CD3 ($p=0,080$), independente da ação dos IFN-α e IFN-β (Figura 23). Este aumento na marcação com anexina-V nas células CD8⁻ parece estar relacionado com o aumento de apoptose apenas nos linfócitos T CD4⁺ não estimulados, visto que, observamos correlação entre a marcação com anexina-V nas células CD8⁻ e fragmentação nuclear ($p=0,014$; $r=0,17$) no controle não estimulado e não após o estímulo com anti-CD3 ($p=0,22$; $r=0,33$) (dados não mostrados).

Entretanto, pode-se observar que o aumento de anexina apresentou um possível artefato na correlação com o aumento de fragmentação nuclear (tratando-se de apenas um doador com níveis elevados de apoptose *in vitro*), tanto após estímulo com IFN-α ($p=0,030$; $r=0,58$) quanto com IFN-β ($p=0,0056$; $r=0,64$) (Figura 25), demonstrando que a marcação com anexina-V não seria uma técnica confiável para verificar o efeito pró-apoptótico desses interferons.

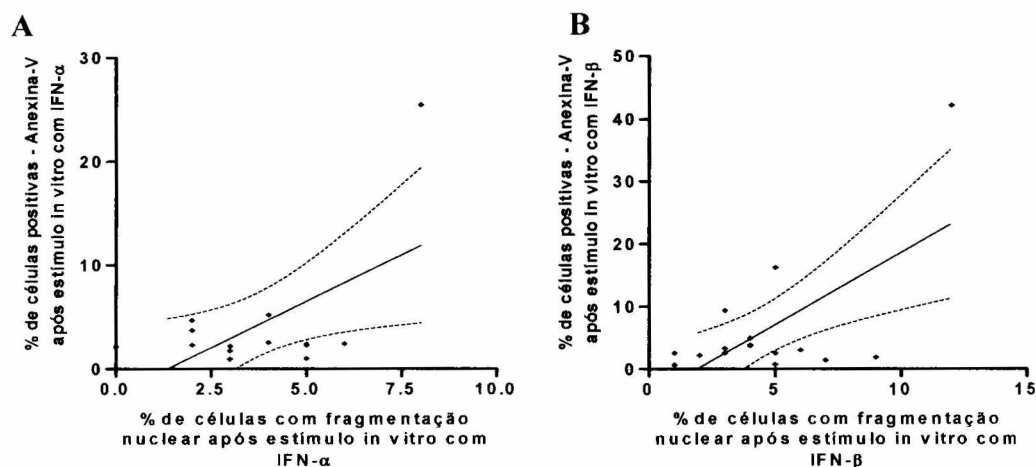


Figura 25. Correlação da quantificação de células apoptóticas por microscopia ótica e marcação *in vitro* de anexina-V em PBMC de doadores normais. Porcentagem de células positivas para anexina-V quantificadas por citometria de fluxo e correlacionadas com a porcentagem de células apresentando fragmentação nuclear quantificada por microscopia ótica em doadores normais após estimulação *in vitro* com (A) IFN- α (n=14) e (B) IFN- β (n=17).

Em relação ao papel do Fas na apoptose *in vitro*, pode-se observar que a fragmentação nuclear espontânea se correlaciona positivamente com a expressão de Fas *ex vivo* ($p=0,024$; $r=0,54$) (Figura 26) indicando que a via de sinalização pelo Fas é importante no processo apoptótico, na ausência de estimulação *in vitro*, nos doadores normais.

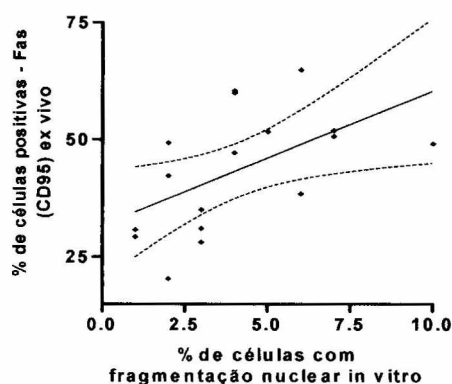


Figura 26. Correlação da quantificação de células apoptóticas por microscopia ótica com a expressão *ex vivo* de CD95 em PBMC de doadores normais. Porcentagem de células positivas para CD95 após quantificação por citometria de fluxo correlacionadas com a porcentagem de células apresentando fragmentação nuclear no controle não estimulado em PBMC de doadores normais (n=17).

No entanto, após estimulação *in vitro* com IFN- α e IFN- β , observou-se que somente IFN- β apresentou um modesto efeito pró-apoptótico quando foi cultivado juntamente com anti-CD3 (Figura 24) e este aumento se correlacionou positivamente com a expressão de Fas ($p=0,010$; $r=0,60$) (dados não mostrados). Essa correlação existe apenas nas células CD8⁻ e após estimulação com IFN- β , sugerindo que os IFN estariam utilizando vias apoptóticas diferenciadas em subpopulações celulares distintas. Na estimulação com IFN- α outras vias Fas-independentes como, por exemplo, o TRAIL, poderiam estar implicadas na apoptose *in vitro* (GHOSH *et al.*, 2003).

4.1.6.4 Correlações do Fenótipo Celular Ex Vivo e o Efeito dos IFN- α e IFN- β , na Apoptose Espontânea e Induzida

Em relação às respostas diferenciadas entre os IFN do tipo I, observa-se na figura 27, que um aumento na população de células TCD4⁺CD25⁺ ex vivo está correlacionado negativamente com o efeito pró-apoptótico do anti-CD3+IFN- β ($p=0,029$; $r=-0,53$) e não do IFN- α , sugerindo que as células TCD4⁺CD25⁺ (possivelmente células T regulatórias ou Treg) estariam inibindo a apoptose, provavelmente em paralelo ao seu efeito anti-proliferativo demonstrado na literatura (SAKAGUCHI *et al.*, 2001).

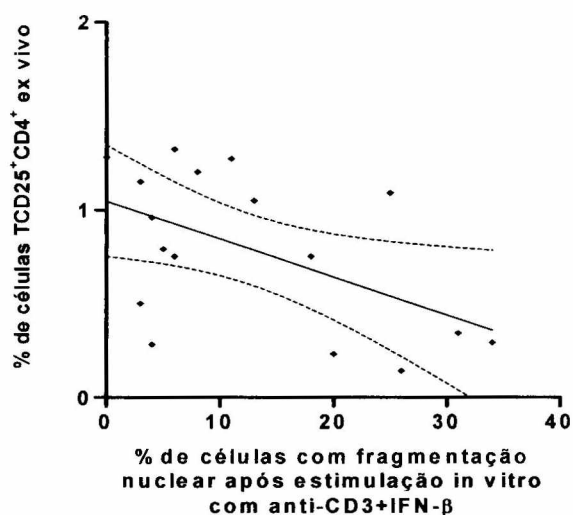


Figura 27. Correlação da marcação com anexina-V *in vitro* e a expressão ex vivo de células TCD4⁺CD25⁺ em PBMC de doadores normais. Porcentagem de células TCD4⁺CD25⁺ ex vivo correlacionadas com a marcação com anexina-V quantificadas por citometria de fluxo (A) porcentagem de células CD8⁺ positivas para anexina-V (n=20) e (B) após estimulação *in vitro* com 0,2 μ M de anti-CD3 e 1000 U.I./mL de IFN- β (n=17).

Por outro lado, a expressão ex vivo de HLA-DR esta relacionado com o efeito proliferativo ($p=0,018$; $r=0,12$) e apoptótico ($p=0,037$; $r=0,84$) do IFN- α , sugerindo o envolvimento da expressão de HLA-DR, ou da ativação celular na ação do IFN- α (Figura 28).

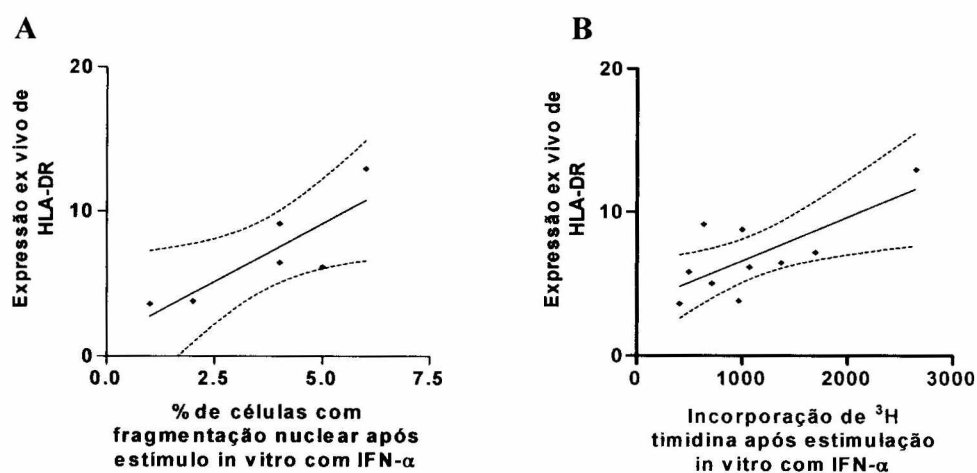


Figura 28. Correlação da marcação com anexina-V *in vitro* e a expressão ex vivo de HLA-DR em PBMC de doadores normais. Porcentagem de células HLA-DR⁺ com (A) porcentagem de células apresentando fragmentação nuclear quantificadas por microscopia ótica após estimulação *in vitro* com 1000 U.I./mL de IFN- α (n=6) e (B) linfoproliferação quantificada por meio da incorporação de 3H-timidina após estimulação *in vitro* com 1000 U.I./mL de IFN- α (n=10).

4.2 PAPEL DA iNOS NA PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE EM INDIVÍDUOS INFECTADOS POR HTLV-I.

A iNOS catalisa a síntese de óxido nítrico (NO) que está envolvido em processos inflamatórios e defesa antimicrobiana. Dependendo da sua concentração, atividade e tipo celular, o NO pode possuir diversos efeitos em relação a apoptose, podendo ser pró- ou anti-apoptótico.

4.2.1 Níveis Ex Vivo de Nitrito (NO_2) e Nitrato (NO_3)

Para estimar os níveis de óxido nítrico circulante e a atividade enzimática da iNOS, foram dosados metabólitos derivados de NO no plasma dos indivíduos infectados com HTLV-I. Ao contrário do esperado, foi possível observar níveis mais elevados nos pacientes com HAM/TSP ($p=0,020$) do que na ATL e em assintomáticos, os quais se mostraram semelhantes aos doadores normais (Figura 29).

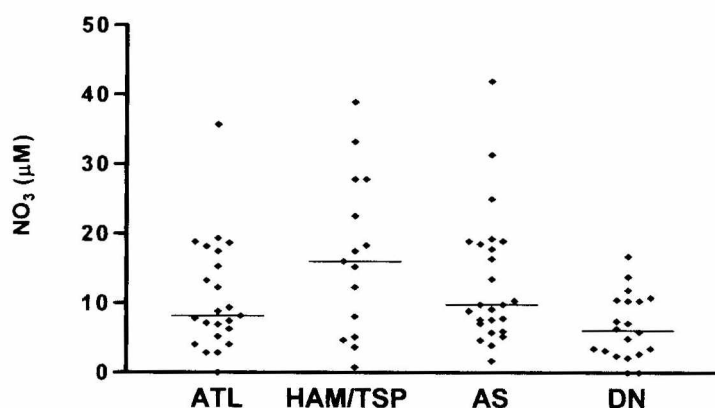


Figura 29. Dosagem de NO_2/NO_3 ex vivo no plasma de indivíduos infectados por HTLV-I. Quantificação de nitrito e nitrato por meio do método de Griess e Vanádio no plasma de pacientes com HAM/TSP ($n=15$), ATL ($n=23$), soropositivos assintomáticos ($n=26$) e doadores normais ($n=20$). A barra representa a média de cada grupo.

4.2.2 Regulação *in vitro* da Linfoproliferação pela iNOS em Indivíduos Infectados por HTLV-I

4.2.2.1 Avaliação dos Efeitos do Inibidor de iNOS (L-NMMA) na Proliferação Espontânea em Indivíduos Infectados por HTLV-I

Na figura 30 observa-se que o inibidor de iNOS foi capaz induzir uma discreta, porém não significativa, resposta antiproliferativa em HAM/TSP ($p=0,27$) e em indivíduos assintomáticos ($p=0,078$). Entretanto, na ATL ($p=0,56$), o L-NMMA parece não apresentar nenhum efeito na atividade proliferativa nestes indivíduos. Em relação aos doadores normais observamos que, embora o grupo seja bem heterogêneo, o LNMMA apresentou um efeito inibitório maior do que nos indivíduos infectados por HTLV-I, porém sem significância estatística ($p=0,13$).

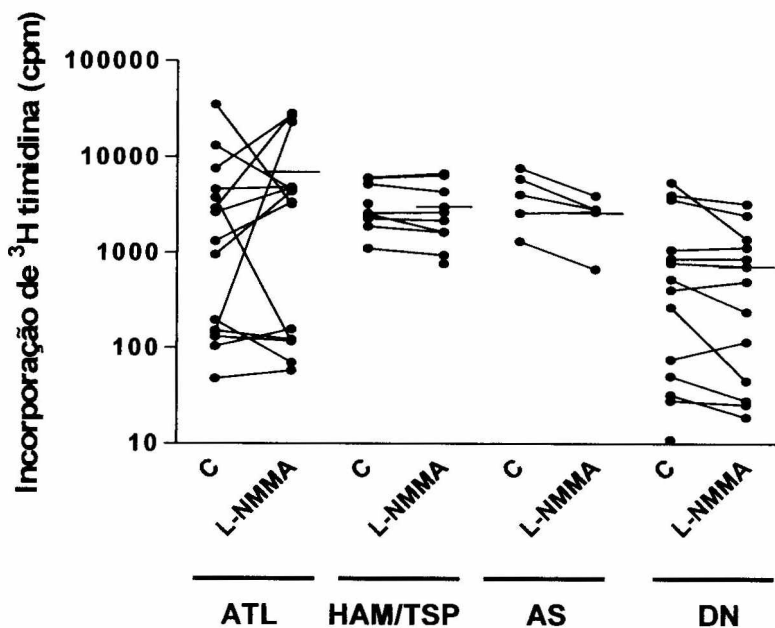


Figura 30. Linfoproliferação espontânea em indivíduos infectados por HTLV-I. Quantificação da linfoproliferação por meio da incorporação de ³H-timidina em PBMC de pacientes com ATL (n=15), HAM/TSP (n=10), assintomáticos (n=5) e doadores normais (n=17) após cultura por 5 dias na presença de 2mM de L-NMMA.

4.2.2.2 Efeito do Inibidor de iNOS na Proliferação Induzida por Anti-CD3 em Indivíduos Infectados por HTLV-I

Avaliou-se se o estímulo com *anti-CD3* seria capaz de influenciar a proliferação espontânea e/ou a resposta antiproliferativa induzida pelo o inibidor de iNOS, e pudemos observar que nos doadores normais ($p=0,0011$) e nos pacientes com ATL ($p=0,017$) o *anti-CD3* foi capaz de aumentar a proliferação, o qual foi antagonizado pela a adição de L-NMMA, mostrando uma redução significativa na proliferação nos doadores normais ($p=0,0079$), mas não nos pacientes com ATL ($p=0,35$) (Figura 31).

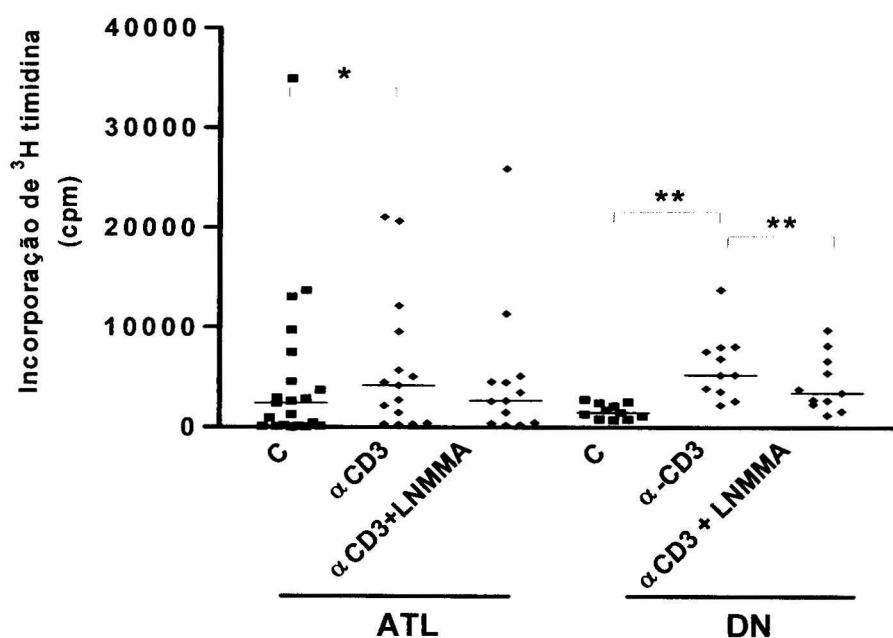


Figura 31. Linfoproliferação induzida por *anti-CD3* em pacientes com ATL e em doadores normais. Quantificação da linfoproliferação por meio da incorporação de ^3H -timidina em PBMC de pacientes com ATL ($n=13$) e doadores normais ($n=12$) após cultura por 5 dias na presença de $0,2\mu\text{g/mL}$ de *anti-CD3* e de $2\mu\text{M}$ de L-NMMA.

4.2.3 Regulação da Apoptose *In Vitro* pela iNOS em Indivíduos Infectados por HTLVI

4.2.3.1 Efeito do L-NMMA na Apoptose Espontânea

Em relação ao possível efeito pró-apoptótico do inibidor de iNOS, verificamos um modesto, mas não significativo aumento na marcação com Anexina-V na HAM/TSP ($p=0,17$), na ATL ($p=0,074$) e nos doadores normais ($p=0,11$) (dados não mostrados). No entanto, o efeito pró-apoptótico do L-NMMA foi confirmado somente nos pacientes com ATL ($p=0,0004$) como observado por intermédio da fragmentação nuclear (Figura 32), de acordo com Sonoki e colaboradores (1999).

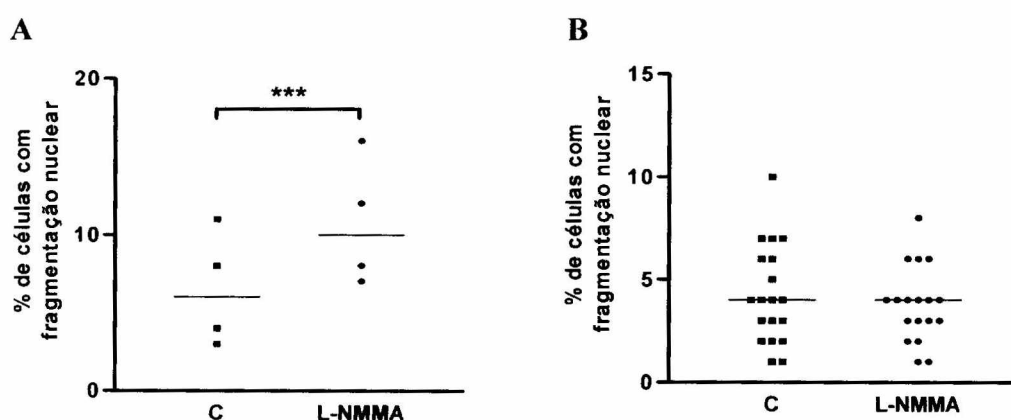


Figura 32. Quantificação de células apoptóticas por microscopia ótica em PBMC de pacientes com ATL e em doadores normais. Porcentagem de células apresentando fragmentação nuclear quantificadas por microscopia ótica em PBMC (A) de pacientes com ATL ($n=4$) e (B) doadores normais ($n=18$) após cultura com $2\mu\text{M}$ de L-NMMA.

4.2.3.2 Avaliação do Efeito do L-Nmma na Apoptose Após Estimulação *In Vitro* com anti-CD3

Buscou-se avaliar se a co-estimulação com anti-CD3 teria alguma influência na resposta apoptótica do inibidor de iNOS e pode-se observar que, assim como na resposta proliferativa, o L-NMMA parece não ter nenhuma influência no efeito do

anti-CD3 na ligação de Anexina-V nos pacientes com ATL ($p=0,87$). Porém, em doadores normais o efeito anti-proliferativo não está correlacionado ($p=0,73$) com o aumento de apoptose, pelo menos enquanto à exposição de fosfatidilserina na membrana celular (dados não mostrados).

Na Figura 33 observa-se que em pacientes com ATL e em doadores normais ($p=0,021$), o estímulo com *anti-CD3* aumentou a fragmentação nuclear confirmando seu efeito pró-apoptótico. Após a co-estimulação com L-NMMA houve um efeito sinérgico significativo em resposta ao anti-CD3 ($p=0,063$) na maioria dos doadores normais (12/20), enquanto que uma minoria (4/20) mostrou um efeito antagônico.

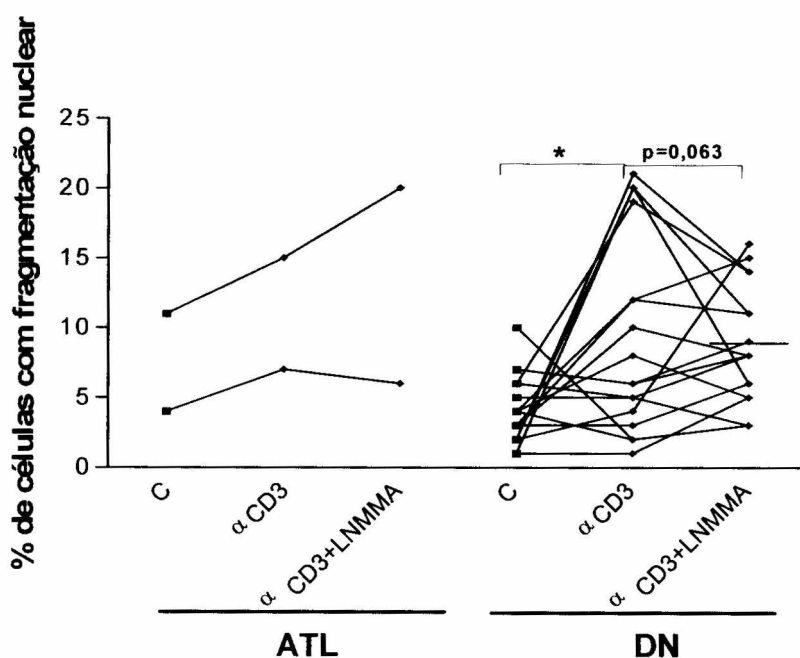


Figura 33. Quantificação de células apoptóticas, após estímulo com *anti-CD3*, por microscopia ótica em PBMC de pacientes com ATL e em doadores normais. Porcentagem de células apresentando fragmentação nuclear quantificadas por microscopia ótica em PBMC de pacientes com ATL ($n=2$) e doadores normais ($n=17$) após cultura por 72 h com $0,2 \mu\text{M}$ de anti-CD3 e $2 \mu\text{M}$ de L-NMMA.

4.2.4 Níveis de Nitrato (NO_3) *In Vitro* Após Estímulo *In Vitro* com Anti-CD3, IFN- α , IFN- β e L-NMMA

Com dosagens dos metabólitos derivados de óxido nítrico no sobrenadante, pode-se observar surpreendentemente que o estímulo com anti-CD3 foi capaz de aumentar a quantidade de nitrato no sobrenadante dos doadores normais ($p=0,059$) e estatisticamente significante nos pacientes com HAM/TSP ($p=0,0087$), sugerindo que um subgrupo de doadores normais estaria apresentando efeito *in vitro* semelhante ao comportamento celular dos pacientes com HAM/TSP (Figura 34).

Em relação ao IFN- β observou-se um aumento de nitrato ($p=0,0061$) nos pacientes com HAM/TSP, provavelmente em consequência da indução da iNOS pelo IFN- β , mas não pelo IFN- α , corroborando com um maior efeito do IFN- β na indução de outros genes STAT-1 dependentes (Fas e CD86).

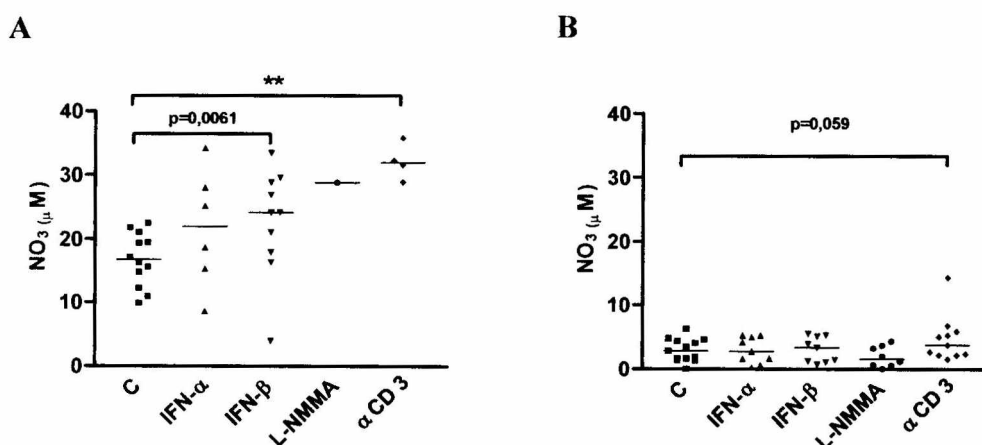


Figura 34. Dosagem de NO_2/NO_3 após estimulação *in vitro*. Quantificação de nitrito e nitrato pelo método de Griess e Vanádio no sobrenadante após cultura *in vitro* estimulados com $0,2\mu\text{M}$ de anti-CD3, com 1000 U.I./mL de IFN- α e de IFN- β e $2\mu\text{M}$ de L-NMMA de (A) pacientes com HAM/TSP (anti-CD3 $n=4$, IFN- α $n=6$, IFN- β $n=10$ e L-NMMA $n=1$) e (B) doadores normais (anti-CD3 $n=11$, IFN- α $n=9$, IFN- β $n=9$ e L-NMMA $n=8$).

5 DISCUSSÃO

Os interferons são envolvidos principalmente por sua atividade antiviral, entretanto, também apresentam importante ação pró-apoptótica, anti-proliferativa e imunomodulatória. Nas patologias associadas ao HTLV-I, os IFN- α e IFN- β apresentam um efeito terapêutico benéfico, porém seus mecanismos de ação ainda permanecem pouco esclarecidos, o que torna importante a identificação de possíveis marcadores biológicos da eficácia destes interferons.

Brito-Melo e colaboradores (2004) mostraram um aumento na porcentagem de linfócitos T CD8⁺ ativados (HLA-DR⁺) e uma diminuição nas células B (CD19⁺) circulantes levando a um aumento na razão entre as células T/B o que poderiam ser considerados importantes marcadores imunológicos da infecção, visto que os pacientes com HAM/TSP apresentaram níveis bem mais elevados em comparação aos indivíduos assintomáticos e doadores normais. Em concordância com estes dados, nós também pudemos observar que, nos pacientes com HAM/TSP, houve uma diminuição na porcentagem de células B (CD19⁺) correlacionada com o aumento do tempo de doença. Em contraste, nos pacientes com ATL, as células B parecem preservadas, enquanto diminuem os níveis de células citotóxicas CD8⁺ e NK (CD56⁺), favorecendo a hipótese de que outras subpopulações linfocitárias, além das células T, teriam um papel na patogênese de HAM/TSP e ATL. Por outro lado, dentro da subpopulação de células B, o que chama atenção são as diferenças entre a expressão de CD80 e CD86, como já havia sido observado na esclerose múltipla com aumento de CD80 e HLA-DR nas células B nas fases exacerbadas, mas não na fase estável da doença (GENÇ *et al.*, 1997).

Nos pacientes com HAM/TSP, o CD80 mostrou correlação significativa com a escala de Kurtzke nos linfócitos totais e principalmente dentro da subpopulação de células B, indicando que esta molécula estaria associada com a progressão da doença e piora clínica nestes indivíduos. Além disso, foi observada uma expressão elevada dessa molécula em mulheres quando comparado aos homens, semelhante ao observado na esclerose múltipla o que pode estar relacionado também com risco aumentado das mulheres infectadas desenvolverem HAM/TSP (2,5:1 a 3:1) (PROIETTI *et al.*, 2005). Em contraste com o CD80, o CD86 parece estar mais associado a um bom prognóstico clínico na HAM/TSP, sendo que a sua expressão em monócitos correlaciona negativamente com a escala de Kurtzke ($p=0,016$ $r=-0,70$) corroborando os resultados de Genç e colaboradores em 1997. Esses dados sugerem que além de o CD80 e o CD86 serem bons marcadores da evolução clínica, pode ser considerado marcadores da resposta terapêutica ao IFN- β .

Nas patologias associadas ao HTLV-I, o IFN- α vem sendo utilizado extensivamente no tratamento de ATL, (HERMINE *et al.*, 1995; MATUTES *et al.*, 2001; MAHIEUX e HERMINE, 2005) e no tratamento de HAM/TSP (IJICHI *et al.*, 1995; IZUMO *et al.*, 1996) enquanto que o IFN- β que é preferencialmente utilizado no tratamento de esclerose múltipla (ARBIZU *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2001; OSSEGE *et al.*, 2001), foi introduzido recentemente no tratamento da HAM/TSP, demonstrando uma melhora em algumas funções motoras e ausência de significativa progressão clínica (OH *et al.*, 2005). Neste ensaio clínico, o IFN- β além de reduzir a expressão RNAm de *tax* e a frequência de células CD8⁺ específicas para HTLV-I, também foi capaz de diminuir a linfoproliferação (OH *et al.*, 2005) o que corrobora os dados obtidos nesta pesquisa, *in vitro*, em que o IFN- β , mas não o IFN- α , apresentou um marcante efeito antiproliferativo, em pacientes com HAM/TSP, significativamente

maior do que em pacientes com ATL, em indivíduos assintomáticos e em doadores normais, confirmando uma resposta diferenciada do IFN- β *in vitro*, como também já havia sido observado na esclerose múltipla (VAN WEYENBERGH *et al.*, 1998). Contrastando com os resultados obtidos, clones de células T de pacientes com HAM/TSP foram resistentes ao efeito antiproliferativo do IFN- β (SMITH *et al.*, 1999). No entanto, pode-se sugerir que o uso de PBMC *ex vivo* seria mais próximo das condições fisiológicas nos pacientes, em comparação com clones de células T gerados *in vitro*.

Esse efeito anti-proliferativo do IFN- β , *in vitro*, pode ser clinicamente relevante, visto que, observa-se uma correlação positiva da incorporação de ^3H timidina (cpm) com a escala de Kurtzke nos pacientes com HAM/TSP. Por outro lado, o efeito antiproliferativo do IFN- β , *in vivo*, poderia ser reflexo de uma atividade pró-apoptótica nestes indivíduos, já que os interferons, principalmente os IFN do tipo I, são capazes de aumentar a expressão de Fas *ex vivo* em pacientes com HAM/TSP, ATL e em doadores normais (Figura 10). Novamente, o efeito do IFN- β foi maior do que o IFN- α no aumento de Fas, tanto na HAM/TSP quanto na ATL.

A elevada expressão de Fas, *ex vivo*, observada na HAM/TSP se correlacionou negativamente com o tempo de doença nestes pacientes, sugerindo que a expressão de Fas estaria atuando nas fases iniciais dessa patologia (Figura 3), concordando com os dados anteriormente publicados sobre o envolvimento do Fas na HAM/TSP, onde demonstraram que a expressão constitutiva do mRNA de Fas e FasL detectada na medula espinhal poderia estar indicando o envolvimento de Fas e FasL no processo inflamatório no sistema nervoso central desses pacientes (UMEHARA *et al.*, 2001).

Contudo, o efeito antiproliferativo e no aumento de Fas do IFN- β parece não estar relacionado com a apoptose em pacientes com HAM/TSP, pois apesar de ter sido observado um leve aumento na marcação com anexina-V, não foi confirmado pelas análises de fragmentação nuclear por meio de ELISA e lâminas coradas com HE. Corroborando os dados obtidos, Furukawa e colaboradores (2000) observaram que a exposição de fosfatidilserina e marcação com anexina-V em células B (CD19⁺) não refletiu uma resposta pró-apoptótica nos pacientes com HAM/TSP, indicando que a exposição de fosfatidilserina pode não ser um evento exclusivo do processo apoptótico, mas ser consequência de um dano reversível na membrana plasmática dos linfócitos podendo criar um sítio de coagulação e inflamação e contribuir para complicações nessas patologias. Portanto, o aumento observado na marcação com anexina-V pode ser um evento associado à ativação da enzima escramblase independente da apoptose, visto que, já foi demonstrado em linfócitos normais que um aumento de cálcio citossólico pode levar a exposição de fosfatidilserina via escramblase (WILLIAMSON *et al.*, 2001), assim como a sua regulação pelo IFN- α via STAT-1 (ZHAO *et al.*, 2005) sugerindo que a marcação com anexina-V *ex vivo* pode estar mais correlacionada com a produção dos IFN- α e IFN- β *in vivo* e não com apoptose.

Por outro lado, o IFN- β , mas não o IFN- α mostrou-se estatisticamente significativo no aumento da marcação com anexina-V e aumento de caspase-3 ativada nos pacientes com ATL, indicando a participação do IFN- β nos eventos iniciais da morte celular por apoptose nestes pacientes. Entretanto, ainda existem muitos dados conflitantes sobre os efeitos dos interferons tipo I, no que diz respeito a sua atividade pró- ou anti-proliferativa e apoptótica, *in vivo* e *in vitro*.

Embora os IFN- α e IFN- β se liguem ao mesmo receptor celular, o IFNAR (receptor de IFN do tipo I), que ativa a via de transdução de sinal Jak/STAT (Janus Kinase associada ao receptor/ativador da transcrição e transdutor de sinal) (SAMUEL, 2001), existem diferenças moleculares e farmacocinéticas entre os IFN do tipo I. Por exemplo, a maior capacidade do IFN- β de fosforilar STAT-1, comparado com o IFN- α é associada a maior capacidade pró-apoptótica *in vitro* em células de sarcoma de Ewing (SANCÉAU *et al.*, 2000).

Existem muitas moléculas (genes) de sinalização que são preferencialmente ativadas pelo IFN- β e não pelo IFN- α , como recentemente revisado por Rani e Ransoho (2005), as quais estariam reforçando a hipótese levantada neste trabalho de que o IFN- β estimula cascatas moleculares diferentes e talvez fosse mais eficaz como alvo terapêutico. Dentre estas moléculas ativadas pelos IFNs, pode-se citar o TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) que foi selecionada recentemente como possível marcador do tratamento pelo IFN- β na esclerose múltipla (WANDINGER *et al.*, 2003). De acordo com Chawla-Sarkar e colaboradores (2001), o IFN- β , mas não o IFN- α , é capaz de induzir a expressão de mRNA do TRAIL, tornando as células de melanoma susceptíveis à apoptose. Por outro lado, foi demonstrado em linhagens celulares leucêmicas que IFN- α induz apoptose dependente de TRAIL apenas em conjunto com AZT (GHOSH *et al.*, 2003), embora não tenha sido verificado o efeito do IFN- β nessas linhagens celulares.

O anti-CD3 é uma molécula conhecida por suas atividades mitogênicas em linfócitos T, podendo promover um superestímulo levando à morte por apoptose caracterizada como morte celular induzida por ativação (AICD). Nas patologias associadas ao HTLV-I, o anti-CD3 foi mostrado *in vitro* como potencializador da

AICD nas células T, após interação com monócitos infectados, diminuindo assim a quantidade de células auto-reativas (WAKAMATSU *et al.*, 1999).

O anticorpo monoclonal CD3 apresenta, em geral, capacidade de induzir tolerância imune antígeno-específica na ausência de uma atividade imunossupressora crônica (CHATENOUD, 2006). Formas modificadas do anti-CD3 tem sido referidas como possíveis indutores de tolerância em transplantes e auto-imunidade, assim como na diabetes do tipo 1, onde foi observado um efeito modulatório do anti-CD3 envolvendo a indução de células TCD8+CD25+ regulatórias (BISIKIRSKA *et al.*, 2005). Um outro estudo *in vivo* demonstrou que o tratamento com anti-CD3 por via oral, foi capaz de suprimir a resposta auto-imune na encefalomielite por intermédio da indução de células T CD4+CD25+, demonstrando uma eficácia clínica nesse modelo murino de doença neurodegenerativa (OCHI *et al.*, 2006).

Por outro lado, foi demonstrado no tratamento de leucemia linfocítica crônica, que a estimulação *in vitro* com anti-CD3 proporciona um decréscimo no número de células B leucêmicas concomitantemente ao aumento de células T ativadas (com potente atividade anti-leucêmica *in vitro*) (BONYHADI *et al.*, 2005).

Contudo, esses achados sugerem que o anti-CD3 poderia ser testado como ferramenta terapêutica nas patologias associadas ao HTLV-I, considerando-se a possibilidade do uso combinado com IFN ou outras drogas imunomodulatórias visto que se pode verificar um efeito proliferativo e pró-apoptótico do anti-CD3 *in vitro* em pacientes com HAM/TSP, ATL e em doadores normais, observado pela marcação com anexina V e confirmado pela fragmentação nuclear. Este efeito pró-apoptótico poderia ocorrer pela indução de morte celular induzida por ativação (AICD) como descrito anteriormente, em doadores normais, por Tretter e colaboradores. (1998).

Entretanto, seus mecanismos de ação também precisam ser elucidados uma vez que o anti-CD3 pode apresentar um efeito pró- ou anti-proliferativo a depender do perfil imune de cada indivíduo, o que torna necessário uma possível avaliação pré-clínica (*in vitro*), com o intuito de chegar a um esquema terapêutico personalizado.

A NO *sintase induzível* (iNOS) e seu possível efeito anti-apoptótico foi descrita inicialmente em clones de células T isolados de pacientes com Leucemia de células T no Adulto (ATL) (SONOKI *et al.*, 1999; MORI *et al.*, 1999), observando-se semelhança com o que é observado em linhagens de células isoladas de pacientes com Leucemia de células B (ZHAO *et al.*, 1998); com isto foram abertas novas perspectivas terapêuticas baseadas na utilização de inibidor seletivo de iNOS.

Os resultados desta pesquisa demonstram níveis elevados de metabólitos derivados de óxido nítrico no plasma de pacientes com HAM/TSP quando comparado com assintomáticos, pacientes com ATL e doadores normais, o que poderia representar uma maior atividade biológica da iNOS nesses pacientes, em contraste com os dados obtidos anteriormente. Na dissertação de mestrado da autora, foi observado aumento de mRNA de iNOS nos indivíduos assintomáticos comparados com HAM/TSP, sugerindo que a regulação pós-transcricional da iNOS, ou a presença de outras isoformas da NO sintase (nNOS e eNOS), poderiam estar provocando o aumento de nitrato no plasma desses pacientes (ALDERTON *et al.*, 2001).

Entretanto, Maloney e colaboradores (2000) mostraram uma diminuição dos níveis de nitrito/nitrato no líquido cefalorraquidiano em pacientes com HAM/TSP, sem influenciar a ativação imune do sistema nervoso central, indicando que os

níveis de nitrito/nitrato não apresentam correlação com o quadro clínico nesses pacientes.

Em relação à possível atividade pró-apoptótica da iNOS, observa-se que o inibidor de iNOS (L-NMMA) não determinou ação anti-proliferativa nem pró-apoptótica significativa nos pacientes com HAM/TSP e assintomáticos; no entanto, mostrou-se pró-apoptótico nos pacientes com ATL, de acordo com os dados publicados por Sonoki e colaboradores (1999). Nos doadores normais, o L-NMMA, foi anti-proliferativo após estimulação *in vitro* com anti-CD3, mas não apresentou correlação com o aumento da capacidade pró-apoptótica.

Por outro lado, sem estimulação *in vitro*, não foram encontrados níveis detectáveis de nitrito/nitrato nos sobrenadantes de HAM/TSP e ATL. Porém, surpreendentemente, foram detectados níveis significantes de nitrito/nitrato *in vitro* após estimulação com anti-CD3 nos pacientes com HAM/TSP e nos doadores normais. Mais surpreendentemente ainda, em 2/20 doadores normais e em 1 paciente com HAM/TSP, foram detectados níveis elevados de NO após a estimulação com o L-NMMA, o que demonstra uma discrepância frente ao efeito do L-NMMA nos indivíduos infectados e doadores normais. Considerando a recente demonstração da presença de eNOS após estimulação via ligação TCR-CD3 dos linfócitos T (IBIZA *et al.*, 2006) e sabendo que o L-NMMA é um inibidor seletivo da iNOS, este efeito diferenciado do L-NMMA pode ser decorrente da potencialização da eNOS.

Contudo, o papel do NO na regulação das células T ainda permanece controverso em diversas patologias e a iNOS parece não ser alvo terapêutico nas patologias associadas ao HTLV-I.

6 CONCLUSÕES

- O aumento na expressão *ex vivo* de HLA-DR e Fas em pacientes com HAM/TSP e a significativa correlação positiva entre ambos, sugere uma maior ativação linfocitária nos pacientes com HAM/TSP.
- Expressão elevada de CD80 *ex vivo* em linfócitos B nos pacientes HAM/TSP, estaria associada com a progressão da infecção e/ou uma piora clínica nestes pacientes e poderia ser usado como marcador clínico de mau prognóstico.
- IFN- β poderia estar ligado ao aumento *in vivo* do CD86, o qual se correlaciona com melhor quadro clínico nos pacientes com HAM/TSP e a expressão *ex vivo* de CD86 em linfócitos B e monócitos poderia usado como marcador clínico de bom prognóstico.
- IFN- β apresentou um maior efeito anti-proliferativo *in vitro* do que o IFN- α na proliferação espontânea e induzida (HAM/TSP e ATL) e aumentou a ativação significativamente de caspase-3 em pacientes com ATL, sugerindo uma maior eficácia clínica do que o IFN- α .
- O IFN- β induz NOx *in vitro* em pacientes com HAM/TSP, porém o inibidor de iNOS não apresentou efeito anti-proliferativo e/ou pró-apoptótico *in vitro* nos pacientes com HAM/TSP e ATL.

- De acordo com nossos resultados, podemos sugerir medidas terapêuticas futuras com o uso combinado de IFN- β , podendo substituir o IFN- α , pelo efeito anti-proliferativo, e o anti-CD3, por sua atividade pró-apoptótica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B.B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nat. Rev. Immunol.**, **3(9)**:745-756, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

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

BAMFORD, R.N.; GRANT, A.J.; BURTON, J.D.; PETERS, C.; KURYS, G.; GOLDMAN, C.K.; BRENNAN, J.; ROESSLER, E.; WALDMANN, T.A. The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **91**:4940-4944, 1994.

BANGHAM, C.R. HTLV-1 infections. **J. Clin. Pathol.**, **53(8)**:581-586, 2000.

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

BISIKIRSKA, B.; COLGAN, J.; LUBAN, J.; BLUESTONE, J.A.; HEROLD, K.C. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8+ T cell population and induces CD8+CD25+ Tregs. **J. Clin. Invest.**, **115(10)**:2904-2913, 2005.

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

BOEHM, U.; KLAMP, T.; GROOT, M.; HOWARD, J.C. Cellular responses to interferon-gamma. **Annu. Rev. Immunol.**, **15**:749-795, 1997.

BONYHADI, M.; FROHLICH, M.; RASMUSSEN, A.; FERRAND, C.; GROSMARE, L.; ROBINET, E.; LEIS, J.; MAZIARZ, R.T.; TIBERGHIE, P.; BERENSON, R.J. In vitro engagement of CD3 and CD28 corrects T cell defects in chronic lymphocytic leukemia. **J. Immunol.**, **174(4)**:2366-2375, 2005.

BORDEN, E.C.; LINDNER, D.; DREICER, R.; HUSSEIN, M.; PEERBOOM, D. Second-generation interferons for cancer: clinical targets. **Semin. Cancer Biol.**, **10(2)**:125-144, 2000.

BOYUM, A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyteaggregating agents. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, **97**(Suppl.): 31-50, 1968.

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

BRITO-MELO, G.E.; SOUZA, J.G.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; CATALAN-SOARES, B.; RIBAS, J.G.; THORUM, G.W.; ROCHA, R.D.; MARTINS-FILHO, O.A. Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV. Establishing phenotypic features associated with morbidity in human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **11**(6):1105-1110, 2004.

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

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

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

CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; PROIETTI, F. A. Interdisciplinary HTLV Research Group. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cad. Saude Publ.**, **21**(3):926-931, 2005.

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

CHATENOUD, L. CD3-Specific Antibodies as Promising Tools to Aim at Immune Tolerance in the Clinic. **Int. Rev. Immunol.**, **25**(3):215-233, 2006.

CHAWLA-SARKAR, M.; LEAMAN, D.W.; BORDEN, EC. Preferential induction of apoptosis by interferon (IFN)-beta compared with IFN-alpha2: correlation with TRAIL/Apo2L induction in melanoma cell lines. **Clin. Cancer Res.**, **7**(6):1821-1831, 2001.

CHAWLA-SARKAR, M.; LINDNER, D.J.; LIU, Y.F.; WILLIAMS, B.R.; SEN, G.C.; SILVERMAN, R.H.; BORDEN, E.C. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. **Apoptosis**, **8**(3):237-249, 2003.

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

CHLICHLIA, K.; LOS, M.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; GAZZOLO, L.; SCHIRRMACHER, V.; KHAZAIE, K. Redox events in HTLV-1 Tax-induced apoptotic T-cell death. **Antioxid Redox Signal.**, **4**(3):471-477, 2002.

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

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

DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, **141**(7):2407-2412, 1988.

DOURADO, I.; ALCANTARA, L.C.; BARRETO, M.L.; DA GLORIA TEIXEIRA, M.; GALVAO-CASTRO, B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **34**(5):527-531, 2003.

DOURADO, I.; ANDRADE, T.; CARPENTER, C.L.; GALVAO-CASTRO, B. Risk factors for human T cell lymphotropic virus type I among injecting drug users in northeast Brazil: possibly greater efficiency of male to female transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**:13-18, 1999.

EVERETT, H.; MCFADDEN, G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. **Trends Microbiol.**, **7**(4):160-165, 1999.

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

FURUKAWA, Y.; BANGHAM, C.R.; TAYLOR, G.P.; WEBER, J.N.; OSAME, M. Frequent reversible membrane damage in peripheral blood B cells in human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Clin. Exp. Immunol.**, **120**(2):307-316, 2000.

FURUKAWA, Y.; SAITO, M.; MATSUMOTO, W.; USUKU, K.; TANAKA, Y.; IZUMO, S.; OSAME, M. 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):1116-1125, 2003.

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

GALVÃO-CASTRO, B.; LOURES, L.; RODRIQUES, L.G.; SERENO, A.; FERREIRA JUNIOR, O.C.; FRANCO, L.G.; MULLER, M.; SAMPAIO, D.A.; SANTANA, A.;

PASSOS, L.M.; PROIETTI, F. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, **37**:242-243, 1997.

GENC, K.; DONA, D.L.; REDER, A.T. Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. **J. Clin. Invest.**, **99**(11):2664-2671, 1997.

GHOSH, S.K.; WOOD, C.; BOISE, L.H.; MIAN, A.M.; DEYEV, V.V.; FEUER, G.; TOOMEY, N.L.; SHANK, N.C.; CABRAL, L.; BARBER, G.N.; HARRINGTON, W.J. JR. Potentiation of TRAIL-induced apoptosis in primary effusion lymphoma through azidothymidine-mediated inhibition of NF-kappa B. **Blood**, **101**(6):2321-2327, 2003.

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

GLOCKZIN S., VON KNETHEN A., SCHEFFNER M., BRUNE B. Activation of the cell death program by nitric oxide involves inhibition of the proteasome. **J. Biol. Chem.**, **274**(28):19581-19586, 1999.

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

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

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

HARHAJ, E.W.; HARHAJ, N.S.; GRANT, C.; MOSTOLLER, K.; ALEFANTIS, T.; SUN, S.C.; WIGDAHL, B. Human T cell leukemia virus type I Tax activates CD40 gene expression via the NF-kappa B pathway. **Virology**, **333**(1):145-158, 2005.

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

HISCOTT, J.; PETROPOULOS, L.; LACOSTE, J. Molecular interactions between HTLV-1 Tax protein and the NF-kappa B/kappa B transcription complex. **Virology**, **214**(1):3-11, 1995.

HOCKENBERY, D. Defining apoptosis. **Am. J. Pathol.**, **146**(1):16-19, 1995.

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

HUA, L.L.; LIU, J.S.; BROSNAN, C.F.; LEE, S.C. Selective inhibition of human glial inducible nitric oxide synthase by interferon-beta: implications for multiple sclerosis. **Ann. Neurol.**, **43**(3):384-387, 1998.

IBIZA, S.; VICTOR, V.M.; BOSCA, I.; ORTEGA, A.; URZAINQUI, A.; O'CONNOR, J.E.; SANCHEZ-MADRID, F.; ESPLUGUES, J.V.; SERRADOR, J.M. Endothelial nitric oxide synthase regulates T cell receptor signaling at the immunological synapse. **Immunity**, **24**(6):753-765, 2006.

IGAKURA, T.; STINCHCOMBE, J.C.; GOON, P.K.; TAYLOR, G.P.; WEBER, J.N.; GRIFFITHS, G.M.; TANAKA, Y.; OSAME, M.; BANGHAM, C.R. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. **Science**, **299**(5613):1713-1716, 2003.

IJICHI, S.; IZUMO, S.; NAGAI, M.; SHINMYOZU, K.; HALL, W.W.; OSAME, M. Anti-viral and immunomodulatory effects of interferon-alpha on cultured lymphocytes from

patients with human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). **J. Neuroimmunol.**, **61**:213-221, 1995.

IZUMO, S.; GOTO, I.; ITOYAMA, Y.; OKAJIMA, T.; WATANABE, S.; KURODA, Y.; ARAKI, S.; MORI, M.; NAGATAKI, S.; MATSUKURA, S.; AKAMINE, T.; NAKAGAWA, M.; YAMAMOTO, I.; OSAME, M. Interferon-alpha is effective in HTLV-I-associated myelopathy: a multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. **Neurology**, **46**:1016-1021, 1996.

JACOBSON, S.; SHIDA, H.; MCFARLIN, D.E.; FAUCI, A.S.; KOENIG, S. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. **Nature**, **348**(6298):245-248, 1990.

JEANG, K.T.; GIAM, C.Z.; MAJONE, F.; ABOUD, M. Life, death, and tax: role of HTLV-I oncoprotein in genetic instability and cellular transformation. **J. Biol. Chem.**, **279**(31):31991-31994, 2004.

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

KANNAGI, M.; HARADA, S.; MARUYAMA, I.; INOKO, H.; IGARASHI, H.; KUWASHIMA, G.; SATO, S.; MORITA, M.; KIDOKORO, M.; SUGIMOTO, M. 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):761-767, 1991.

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

KINOSHITA, K.; HINO, S.; AMAGASKI, T.; IKEDA, S.; YAMADA, Y.; SUZUYAMA, J.; MOMITA, S.; TORIYA, K.; KAMIHIRA, S.; ICHIMARU, M. Demonstration of adult T-

cell leukemia virus antigen in milk from three sero-positive mothers. **Gann**, **75**:103-105, 1984.

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

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

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

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

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

KURTZKE, J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). **Neurology**, **33**:1444-1452, 1983.

LE BON, A.; ETCHART, N.; ROSSMANN, C.; ASHTON, M.; HOU, S.; GEWERT, D.; BORROW, P.; TOUGH, D.F. Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. **Nat. Immunol.**, **4**(10):1009-10015, 2003.

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

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

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

MAEDA, K.; SATO, T.; AZUMA, M.; YAGITA, H.; OKUMURA, K. Characterization of rat CD80 and CD86 by molecular cloning and mAb. **Int. Immunol.**, **9**(7):993-1000, 1997.

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

MAHIEUX, R.; HERMINE, O. In vivo and in vitro treatment of HTLV-1 and HTLV-2 infected cells with arsenic trioxide and interferon-alpha. **Leuk. Lymphoma**, **46**(3):347-355, 2005.

MALONEY, E.M.; ST CLAIRE MORGAN, O.; WIDNER, B.; WERNER, E.R.; FUCHS, D. Central nervous system activation of the indoleamine-2,3-dioxygenase pathway in human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J. Infect. Dis.**, **181**(6):2037-2040, 2000.

MANEL, N.; BATTINI, J.L.; TAYLOR, N.; SITBON, M. HTLV-1 tropism and envelope receptor. **Oncogene**, **24**(39):6016-6025, 2005.

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

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

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

MARRIOTT, S.J.; LEMOINE, F.J.; JEANG, K.T. Damaged DNA and miscounted chromosomes: human T cell leukemia virus type I tax oncoprotein and genetic lesions in transformed cells. **J. Biomed. Sci.**, **9**(4):292-298, 2002.

MATSUI, M.; KURODA, Y. Aberrant immunity in the central nervous system in relation to disease progression in HAM/TSP. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **82**(3):203-206, 1997.

MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology**, **2**(1):27, 2005.

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

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; WINK, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide**, **5**(1):62-71, 2001.

MOORE, G.R.; TRAUGOTT, U.; SCHEINBERG, L.C.; RAINE, C.S. Tropical spastic paraparesis: a model of virus-induced, cytotoxic T-cell-mediated demyelination?. **Ann. Neurol.**, **26**(4):523-530, 1989.

MORI, E.; THOMAS, M.; MOTOKI, K.; KATAIKA, S. Distinct function of monoclonal antibody to TRAIL-R2 as potentiator or inhibitor of the ligand TRAIL-induced apoptosis. **FEBS Lett.**, **579**(24):5379-5384, 2005.

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

MORRISON, B.H.; BAUER, J.A.; KALVAKOLANU, D.V.; LINDNER, D.J. Inositol hexakisphosphate kinase 2 mediates growth suppressive and apoptotic effects of interferon-beta in ovarian carcinoma cells. **J. Biol. Chem.**, **276**(27):24965-24970, 2001.

MOSTOLLER, K.; NORBURY, C.C.; JAIN, P.; WIGDAHL, B. Human T-cell leukemia virus type I Tax induces the expression of dendritic cell markers associated with maturation and activation. **J. Neurovirol.**, **10**(6):358-371, 2004.

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

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

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

NG, P.W.; IHA, H.; IWANAGA, Y.; BITTNER, M.; CHEN, Y.; JIANG, Y.; GOODEN, G.; TRENT, J.M.; MELTZER, P.; JEANG, K.T.; ZEICHNER, S.L. Genome-wide expression changes induced by HTLV-1 Tax: evidence for MLK-3 mixed lineage kinase involvement in Tax-mediated NF-kappaB activation. **Oncogene**, **20**(33):4484-4496, 2001.

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

NISHIURA, Y.; NAKAMURA, T.; FUKUSHIMA, N.; MORIUCHI, R.; KATAMINE, S.; EGUCHI, K. Increased mRNA expression of Th1-cytokine signaling molecules in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Tohoku J. Exp. Med.**, **204**(4):289-298, 2004.

OCHI, H.; ABRAHAM, M.; ISHIKAWA, H.; FRENKEL, D.; YANG, K.; BASSO, A.S.; WU, H.; CHEN, M.L.; GANDHI, R.; MILLER, A.; MARON, R.; WEINER, H.L. Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4+ CD25- LAP+ T cells. **Nat. Med.**, **12**(6):627-635, 2006.

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

OPFERMAN, J.T.; KORSMEYER, S.J. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. **Nat. Immunol.**, **4**(5):410-415, 2003.

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

PARKER, C.E.; DAENKE, S.; NIGHTINGALE, S.; BANGHAM, C.R. Activated, HTLV-1-specific cytotoxic T-lymphocytes are found in healthy seropositives as well as in patients with tropical spastic paraparesis. **Virology**, **188**(2):628-636, 1992.

PHILCHENKOV, A. Caspases: potential targets for regulating cell death. **J. Cell Mol. Med.**, **8**(4):432-444, 2004.

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

PIQUE, C.; URETA-VIDAL, A.; GESSAIN, A.; CHANCEREL, B.; GOUT, O.; TAMOUZA, R.; AGIS, F.; DOKHELAR, M.C. Evidence for the chronic in vivo production of human T cell leukemia virus type I Rof and Tof proteins from cytotoxic T lymphocytes directed against viral peptides. **J. Exp. Med.**, **191**(3):567-572, 2000.

PROIETTI, F.A.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; CATALAN-SOARES, B.C.; MURPHY, E.L. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene**, **24**(39):6058-6068, 2005.

RANI, M.R.; RANSOHOFF, R.M. Alternative and accessory pathways in the regulation of IFN-beta-mediated gene expression. **J. Interf. Cytok. Res.**, **25**(12):788-798, 2005.

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

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

RICHARDSON, J.H.; HOLLSBERG, P.; WINDHAGEN, A.; CHILD, L.A.; HAFLER, D.A.; LEVER, A.M. Variable immortalizing potential and frequent virus latency in

blood-derived T-cell clones infected with human T-cell leukemia virus type I. **Blood**, **89**:3303-3314, 1997.

ROSS, T.M.; PETTIFORD, S.M.; GREEN, P.L. The tax gene of human T-cell leukemia virus type 2 is essential for transformation of human T lymphocytes. **J. Virol.**, **70**(8):5194-5202, 1996.

SAGGIORO, D.; ACQUASALIENTE, L.; DAPRAI, L.; CHIECO-BIANCHI, L. Inhibition of apoptosis by human T-lymphotropic virus type-1 tax protein. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **1010**:591-597, 2003.

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

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; SHIMIZU, J.; YAMAZAKI, S.; SAKIHAMA, T.; ITOH, M.; KUNIYASU, Y.; NOMURA, T.; TODA, M.; TAKAHASHI, T. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. **Immunol. Rev.**, **182**:18-32, 2001.

SAMUEL, C.E. Antiviral actions of interferons. **Clin. Microbiol. Rev.**, **14**(4):778-809, 2001. Table of contents.

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

SANTOS, S.B.; PORTO, A.F.; MUNIZ, A.L.; DE JESUS, A.R.; MAGALHAES, E.; MELO, A.; DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J.; CARVALHO, E.M. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. **BMC Infect. Dis.**, **4**:7, 2004.

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

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

SCIORATI, C.; ROVERE, P.; FERRARINI, M.; PAOLUCCI, C.; HELTAI, S.; VAIANI, R.; CLEMENTI, E.; MANFREDI, A.A. Generation of nitric oxide by the inducible nitric oxide synthase protects gamma delta T cells from *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptosis. **J. Immunol.**, **163**(3):1570-1576, 1999.

SIBON, D.; GABET, A.S.; ZANDECKI, M.; PINATEL, C.; THETE, J.; DELFAU-LARUE, M.H.; RABAAOUI, S.; GESSAIN, A.; GOUT, O.; JACOBSON, S.; MORTREUX, F.; WATTEL, E. HTLV-1 propels untransformed CD4 lymphocytes into the cell cycle while protecting CD8 cells from death. **J. Clin. Invest.**, **116**(4):974-983, 2006.

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

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

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

SUZUKI, T.; HIRAI, H.; FUJISAWA, J.; FUJITA, T.; YOSHIDA, M. A trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 binds to NF-kappa B p50 and serum

response factor (SRF) and associates with enhancer DNAs of the NF-kappa B site and CArG box. **Oncogene**, **8**:2391-2397, 1993.

TAKAMOTO, T.; MAKINO, M.; AZUMA, M.; KANZAKI, T.; BABA, M.; SONODA, S. HTLV-I-infected T cells activate autologous CD4+ T cells susceptible to HTLV-I infection in a costimulatory molecule-dependent fashion. **Eur. J. Immunol.**, **27**(6):1427-1432, 1997.

THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, **267**:1456-1462, 1995.

THYRELL, L.; ERICKSON, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; POKROVSKAJA, K.; SANGFELT, O.; CASTRO, J.; EINHORN, S.; GRANDER D. Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. **Oncogene**, **21**(8):1251-1262, 2002.

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

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

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

UMEHARA, F.; IZUMO, S.; NAKAGAWA, M.; RONQUILLO, A.T.; TAKAHASHI, K.; MATSUMURO, K.; SATO, E.; OSAME, M. Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **52**(4):424-430, 1993.

UMEHARA, F.; NAKAMURA, A.; IZUMO, S.; KUBOTA, R.; IJICHI, S.; KASHIO, N.; HASHIMOTO, K.; USUKU, K.; SATO, E.; OSAME, M. Apoptosis of T lymphocytes in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy: a possible mechanism to control viral infection in the central nervous system. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, **53**(6):617-624, 1994.

UMEHARA, F.; ITOH, K.; MICHIZONO, K.; ABE, M.; IZUMO, S.; OSAME, M. Involvement of Fas/Fas ligand system in the spinal cords of HTLV-I-associated myelopathy. **Acta Neuropathol.**, **103**(4):384-390, Epub 2001, Dec 15 (2002).

VAN WEYENBERGH, J.; LIPINSKI, P.; ABADIE, A.; CHABAS, D.; BLANK, U.; LIBLAU, R.; WIETZERBIN J. Antagonistic action of IFN-beta and IFN-gamma on high affinity Fc gamma receptor expression in healthy controls and multiple sclerosis patients. **J. Immunol.**, **161**(3):1568-1574, 1998.

WAKAMATSU, S.; MAKINO, M.; TEI, C.; BABA, M. Monocyte-driven activation-induced apoptotic cell death of human T-lymphotropic virus type I-infected T cells. **J. Immunol.**, **163**(7):3914-3919, 1999.

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

WANDINGER, K.P.; LUNEMANN, J.D.; WENGERT, O.; BELLMANN-STROBL, J.; AKTAS, O.; WEBER, A.; GRUNDSTROM, E.; EHRLICH, S.; WERNECKE, K.D.; VOLK, H.D.; ZIPP, F. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. **Lancet**, **361**(9374):2036-2043, 2003.

WATANABE, T.; NAKAMURA, T.; NAGASATO, K.; SHIRABE, S.; OHISHI, K.; ICHINOSE, K.; NISHIURA, Y.; CHIYODA, S.; TSUJIHATA, M.; NAGATAKI, S. Exaggerated messenger RNA expression of inflammatory cytokines in human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy. **Arch. Neurol.**, **52**(3):276-280, 1995.

WILLIAMSON, P.; CHRISTIE, A.; KOHLIN, T.; SCHLEGEL, R.A.; COMFURIUS, P.; HARMSMA, M.; ZWAAL, R.F.; BEVERS, E.M. Phospholipid scramblase activation pathways in lymphocytes. **Biochemistry**, **40**(27):8065-8072, 2001.

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

WU, K.; BOTTAZZI, M.E.; DE LA FUENTE, C.; DENG, L.; GITLIN, S.D.; MADDUKURI, A.; DADGAR, S.; LI, H.; VERTES A, PUMFERY A, KASHANCHI F. Protein profile of tax-associated complexes. **J. Biol. Chem.**, **279**(1):495-508, 2004.

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

YAMAGATA, T.; NISHIDA, J.; TANAKA, S.; SAKAI, R.; MITANI, K.; YOSHIDA, M.; TANIGUCHI, T.; YAZAKI, Y.; HIRAI, H. A novel interferon regulatory factor family transcription factor, ICSAT/Pip/LSIRF, that negatively regulates the activity of interferon-regulated genes. **Mol. Cell Biol.**, **16**(4):1283-1294, 1996.

YAMAGUCHI, K.; WATANABE, T. Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. **Int. J. Hematol.**, **2**:240-245, 2002.

YAMANO, Y.; NAGAI, M.; BRENNAN, M.; MORA, C.A.; SOLDAN, S.S.; TOMARU, U.; TAKENOUCHE, N.; IZUMO, S.; OSAME, M.; JACOBSON S. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). **Blood**, **99**(1):88-94, 2002.

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

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

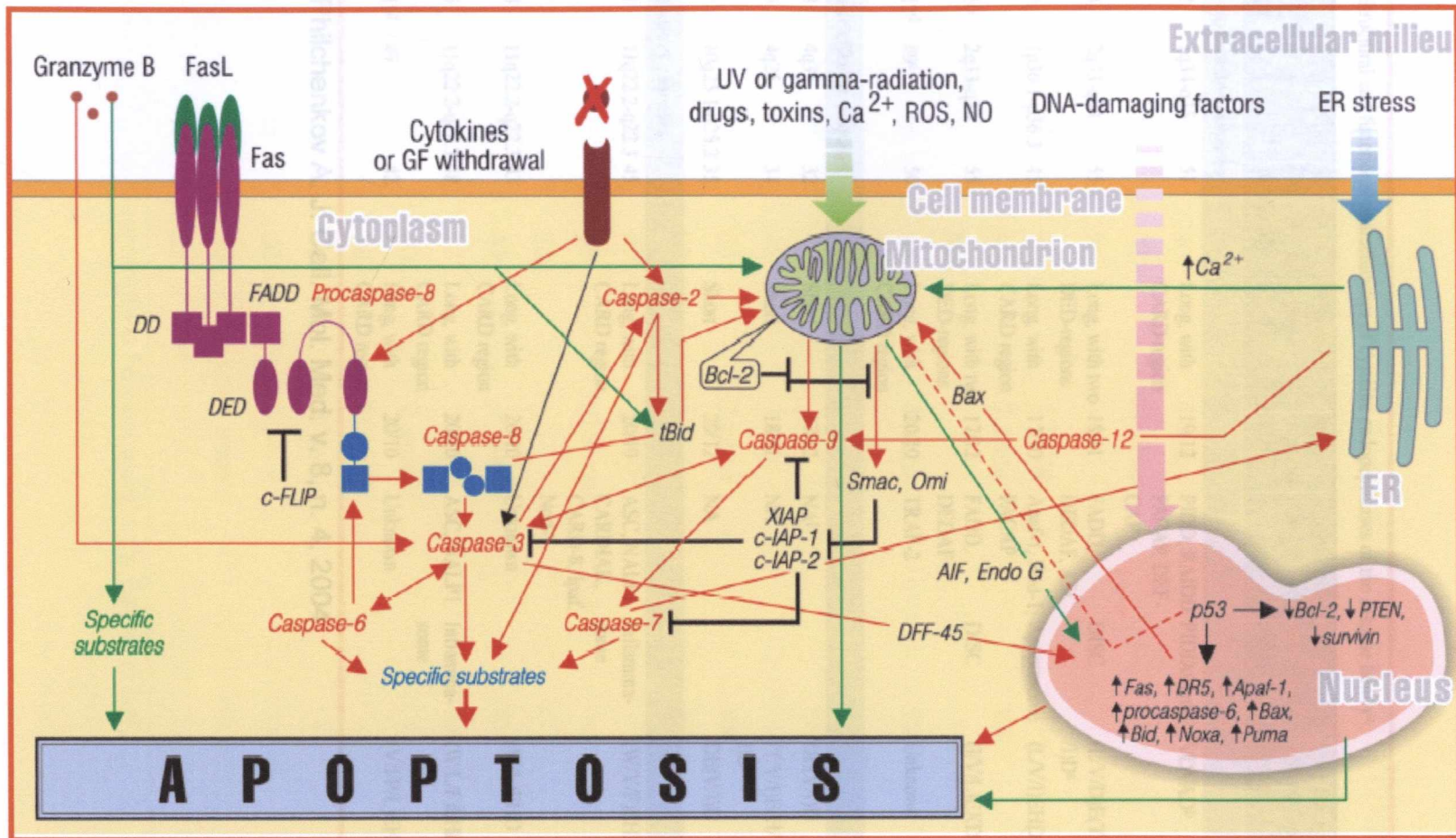
ZHAO, H.; DUGAS, N.; MATHIOT, C.; DELMER, A.; DUGAS, B.; SIGAUX, F.; KOLB, J.P. B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functional inducible nitric oxide synthase displaying anti-apoptotic activity. **Blood**, **92**:1031-1043, 1998.

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

ZHAO, K.W.; LI, D.; ZHAO, Q.; HUANG, Y.; SILVERMAN, R.H.; SIMS, P.J.; CHEN, G.Q. Interferon-alpha-induced expression of phospholipid scramblase 1 through STAT1 requires the sequential activation of protein kinase Cdelta and JNK. **J. Biol. Chem.**, **280**(52):42707-42714, 2005.

ANEXOS

ANEXO A - Vias sinalizadoras da apoptose



Fonte: Philchenkov A. J. Cell. Mol. Med. Vol 8, No 4, 2004

ANEXO B - Características estruturais e funcionais da família das Caspases

Table 1. Structural and functional characteristics of cysteine endopeptidases of the caspase family^a

Enzyme	Map position of gene	Size of enzyme precursor (kDa)	Prodomain type	Active subunits (kDa)	Adaptor proteins	Caspase-activating complex	Caspase proteolytic specificities
Apoptotic initiator caspases							
Caspase-2	7q34-q35	51	Long, with CARD region	19/12	PIDD, RAIDD, PIDDosome? PACAP, DEF-CAP		VDVAD ^b
Caspase-8	2q33-q34	55	Long, with two DED-regions	18/11	FADD, DEDAF, ASC	DISC	(L/V/D)E(T/V/I)D ^c
Caspase-9	1p36.1-p36.3	45	Long, with CARD region	17/10	Apaf-1, Nod-1, Apoptosome PACAP		(L/V/I)EHD
Caspase-10	2q33-q34	55	Long, with two DED-regions	17/12	FADD, DEDAF	DISC	(I/V/L)EXD
Caspase-12 ^d	#9 ^e	50	Long, with CARD region	20/10	TRAF-2		Unknown
Apoptotic effector caspases							
Caspase-3	4q35	32	Short	17/12	NA ^f		DE(V/I)D
Caspase-6	4q25	34	Short	18/11	NA		(T/V/I)E(H/V/I)D
Caspase-7	10q25.1-q25.2	35	Short	20/12	NA		DE(V/I)D
Inflammatory caspases							
Caspase-1	11q22.2-q22.3	45	Long, with CARD region	20/10	ASC, NALP1, CARDIAK, CARD-8, Ipaf, Nod-1	Inflammasome	(W/Y/F)EHD
Caspase-4	11q22.2-q22.3	43	Long, with CARD region	20/10	Unknown		(W/L)EHD
Caspase-5	11q22.2-q22.3	48	Long, with CARD region	20/10	ASC, NALP1	Inflammasome	(W/L/F)EHD
Caspase-11 ^d	#9	42	Long, with CARD region	20/10	Unknown		(V/I/P/L)EHD

Fonte: Philchenkov A. J. Cell. Mol. Med. v. 8, n. 4, 2004.

Fonte: Fundação de Neurologia e Neurocirurgia da Bahia (FNN)

ANEXO C - Características dos Pacientes com HAM/TSP

Amostras	Sexo	Idade	Tempo de doença	Escala KURTZKE
01	M	51	4 anos	K4
02	M	40	4 anos	K4
03	F	40	4 anos	K3
04	F	63	11 anos	K6
05	F	35	-	-
06	M	36	3 anos	K5
07	F	40	2 anos	K6
08	F	60	-	-
09	M	44	4 anos	K4
10	F	40	-	-
11	M	53	-	K3
12	F	45	-	-
13	M	59	3 anos	K4
14	F	60	-	K5
15	M	38	1 ano	-
16	F	59	10 anos	-
17	F	56	-	-
18	F	49	1 ano	K4
19	M	57	1 ano	K6
20	F	49	2 anos	-
21	M	60	10 anos	-
22	M	46	1 ano	-
23	M	50	-	-
24	F	50	4 anos	-
25	F	62	-	-

Fonte: Fundação de Neurologia e Neurocirurgia da Bahia (FNN)

ANEXO D - Características dos Pacientes com ATL

Amostras	Sexo	Idade	Tempo de doença	Manifestação clínica
01	F	52	10 anos e 6 meses	Smoldering
02	F	47	1 ano e 8 meses	Leucemia aguda/ dermatite
03	F	52	3 anos e 9 meses	Leucemia crônica/DIH
04	M	45	9 meses	Leucemia aguda
05	F	47	9 meses	Leucemia aguda
06	M			
07	F	56	1 ano e 3 meses	Leucemia/linfoma/DIH
08	F			Leucemia aguda
09	F			Leucemia/linfoma/DIH
10	M	25	15 anos e 8 meses	Leucemia aguda
11	M	70	3 anos e 6 meses	Smoldering
12	F	50	6 anos e 8 meses	Smoldering
13	F	79	11 anos	Smoldering/DIH
14	M	21	10 anos e 5 meses	Smoldering
15	F		10 anos e 7 meses	Smoldering
16	F	40	5 anos e meses	Leucemia/linfoma/DIH
17	M	64	1 ano	Leucemia aguda
18	M	76	3 anos 6 meses	Smoldering
19	F			
20	M	64	2 anos e 9 meses	Smoldering
21	F	63	2 anos e 3 meses	Smoldering
22	F			
23	M	45	5 anos e 2 meses	Smoldering
24	F		8 anos e 4 meses	Smoldering/DIH
26	M		4 meses	Leucemia aguda/DIH
27	F			DIH
28	M	50	11 meses	Smoldering
29	F	43	10 meses	Leucemia/linfoma
30	M	64	2 anos e 9 meses	Smoldering
31	M	35	10 meses	Smoldering

Fonte: Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES)

ANEXO E - Anticorpos monoclonais conjugados a fluorescência FITC, PE ou PerCP para marcação de moléculas de superfície

Anticorpo	Clone	Companhia	Marcação
IgG1	679.1Mc7	Immunotech	Isotipo controle
IgG2a	R35-95	BD PharMingen	Isotipo controle
anti-CD3	UCHT1	BD PharMingen	Linfócitos T
anti-CD4	RPA-T4	BD PharMingen	Linfócitos T CD4+
anti-CD8	RPA-T4	BD PharMingen	Linfócitos T CD8+
anti-CD19	4G7	BDIS-San Jose	Linfócitos B
anti-CD56	N901	Immunotech	Células T NK
anti-HLA-DR	L243	BD PharMingen	Ativação celular
anti-CD25	M-A251	BD PharMingen	Ativação celular / Células T regulatórias
anti-CD80	MAB104	Immunotech	Co-estimulação
anti-CD86	IT2.2	BD PharMingen	Co-estimulação
anti-CLA	HECA-452	BD PharMingen	Linfócitos cutâneos
anti-CD95	DX2	BD PharMingen	Sinalização da apoptose
anti-CD95L	NOK-1	BD PharMingen	Sinalização da apoptose
anti-TRAIL	RIK-2	BD PharMingen	Sinalização da apoptose
Anexina-V		Bender Medsystems	Fosfatidilserina
Caspase-3 ativa		BD PharMingen	Apoptose

Fonte: diversas

ANEXO F -. Escala de Kurtzke**Kurtzke Expanded Disability Status Scale**

- 0.0 Normal neurological examination
- 1.0 No disability, minimal signs in one FS
- 1.5 No disability, minimal signs in more than one FS
- 2.0 Minimal disability in one FS
- 2.5 Mild disability in one FS or minimal disability in two FS
- 3.0 Moderate disability in one FS, or mild disability in three or four FS. Fully ambulatory
- 3.5 Fully ambulatory but with moderate disability in one FS and more than minimal disability in several others
- 4.0 Fully ambulatory without aid, self-sufficient, up and about some 12 hours a day despite relatively severe disability; able to walk without aid or rest some 500 meters
- 4.5 Fully ambulatory without aid, up and about much of the day, able to work a full day, may otherwise have some limitation of full activity or require minimal assistance; characterized by relatively severe disability; able to walk without aid or rest some 300 meters.
- 5.0 Ambulatory without aid or rest for about 200 meters; disability severe enough to impair full daily activities (work a full day without special provisions)
- 5.5 Ambulatory without aid or rest for about 100 meters; disability severe enough to preclude full daily activities
- 6.0 Intermittent or unilateral constant assistance (cane, crutch, brace) required to walk about 100 meters with or without resting
- 6.5 Constant bilateral assistance (canes, crutches, braces) required to walk about 20 meters without resting
- 7.0 Unable to walk beyond approximately five meters even with aid, essentially restricted to wheelchair; wheels self in standard wheelchair and transfers alone; up and about in wheelchair some 12 hours a day
- 7.5 Unable to take more than a few steps; restricted to wheelchair; may need aid in transfer; wheels self but cannot carry on in standard wheelchair a full day; May require motorized wheelchair
- 8.0 Essentially restricted to bed or chair or perambulated in wheelchair, but may be out of bed itself much of the day; retains many self-care functions; generally has effective use of arms
- 8.5 Essentially restricted to bed much of day; has some effective use of arms retains some self care functions
- 9.0 Confined to bed; can still communicate and eat.
- 9.5 Totally helpless bed patient; unable to communicate effectively or eat/swallow
- 10.0 Death

Fonte: Kurtzke, JF. 1983

ANEXO G - Termo de Consentimento

Eu, _____, fui informado de que este estudo é uma **pesquisa** e que seu objetivo é determinar fatores que influenciam o desenvolvimento das doenças associadas ao vírus HTLV-I.

A participação neste estudo prevê a **doação de 20 ml de sangue** (voluntários e pacientes). Este volume de sangue será utilizado para a realização de exames laboratoriais, como pesquisa de anticorpos contra HTLV-I e II, análise genética do vírus e análise do perfil celular.

Os possíveis desconfortos e riscos inerentes a este procedimento são aqueles relacionados com a retirada de sangue, que podem ser: dor local, e, mais raramente uma infecção. Este é um procedimento médico de rotina e todos os cuidados apropriados serão tomados.

Os resultados deste estudo serão discutidos comigo e considerados confidenciais. Esses resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Minha **participação** neste estudo é **inteiramente voluntária**, e eu sou livre para recusar participar do estudo, ou me retirar em qualquer época após seu início, sem afetar ou prejudicar o cuidado médico que devo receber.

A Dra. Achiléa Bittencourt discutiu comigo esta informação e eu tive a possibilidade de fazer perguntas. Se eu tiver novas perguntas eu poderei contactá-la pelo telefone 339-6335, ou contactar com o pesquisador responsável pelo estudo Dr. Johan Van Weyenbergh, pelo telefone 356-4320 (r264).

Recebi uma cópia deste formulário e tive a oportunidade de tê-lo.

Por ser verdade, consinto voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que o procedimento descrito acima seja realizado em minha pessoa.

Salvador/ BA, ____ de _____, 20 ____.

Assinatura do paciente

Número

Médico Assistente (ou Pesquisador Responsável)
