



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EFEITO DE DROGAS INIBIDORAS DE TNF- α EM
CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO DE INDÍDUOS INFECTADOS PELO
HTLV-I

TÂNIA LUNA

SALVADOR – BAHIA
2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Programa de Pós-Graduação em Imunologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

EFEITO DE DROGAS INIBIDORAS DE TNF- α EM
CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO
DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO
HTLV-I

TÂNIA LUNA

Orientador: Prof. Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como requisito obrigatório para obtenção do grau de Mestre em Imunologia.

SALVADOR – 2005

TÂNIA LUNA

EFEITO DE DROGAS INIBIDORAS DE TNF- α EM CÉLULAS
MONONUCLEARES

DO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-I

Dissertação apresentada para obtenção do grau de mestre

Salvador, 16 de novembro de 2005

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus – Orientadora

Professor Adjunto da UFBA
Docente do PPGIm
Pós Doutorado em Genética Molecular
Doutorado em Imunologia
Mestrado em Medicina

Pro. Dr. Jamary Oliveira Filho

Professor Adjunto da UFBA
Doutorado em Neurologia

Pro. Dra. Fernanda Rios Grassi

Pesquisador Adjunto da Fiocruz/Ba
Professor Adjunto da Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública
Professora do PPGIm
Doutorado em Imunologia
Mestrado em Imunologia
Especialização em : Doenças Infecciosas, Retrovíroses Humanas e
Ciências Biológicas e Médicas

FONTE DE FINANCIAMENTO

- FAPESB Convênio nº 091/02

*“ A vida só pode ser compreendida olhando-se
para trás, mas só pode ser vivida olhando-se para
a frente”*

Soren Kierkegaard

AGRADEÇO A DEUS

Pela dádiva da vida, esse presente que nos permite exercer a capacidade de realizar nossos objetivos e sonhos.

Pelas dificuldades, pois serviram de trampolim pra transformar minha existência em algo mais que uma coleção de lamúrias.

Pela disposição para mudar a rota sempre que necessário.

DEDICO ESTE TRABALHO

A minha filha **Gabriela**, inspiração que impulsiona a minha vida, fonte imensurável de amor. Que esta conquista seja um exemplo para sua vida.

A Velozo companheiro de vida.

Ao meu pai , *“in memória”*.

A minha mãe a quem nenhuma palavra expressaria o meu amor e gratidão, *“in memória”*.

A Milton meu segundo pai, *“in memória”*.

A Sandra Santiago companheira de muitos momentos.

A todos, os que sempre confiaram no meu trabalho e acreditaram nos meus sonhos.

“Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só. Mas sonho que se sonha junto, é realidade”.

Raul Seixas

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A **Prof. Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus**, orientadora e amiga.

Exemplo de competência, dedicação, compreensão e humildade, características que se somam, tornando-a singular.

Sou eternamente grata pelo estímulo, orientação, paciência e compreensão dos meus deslizes.

*“Há pessoas que nos falam e nem as escutamos,
Há pessoas que nos ferem e nem cicatrizes deixam,
Mas há pessoas que simplesmente aparecem em
nossas vidas e nos marcam para sempre.”*

Cecília Meireles

AGRADECIMENTO

Ao **Prof. Dr. Edgar M. Carvalho**, nosso alicerce, que tão sabiamente conduz os nossos sonhos profissionais, minha profunda gratidão pelo apoio e confiança.

AGRADECIMENTOS

Aos **pacientes** pela confiança e colaboração em nosso trabalho, a minha afetuosa homenagem e gratidão.

Agradecimento especial: a **Silvane Braga Santos** pelo companheirismo e amizade, além da importante colaboração na realização deste trabalho.

A **André Muniz** pelo suporte clínico e colaboração durante a realização desse trabalho.

Agradecimentos a, Caroline Andrade Bezerra, Marina Caskey e Daniel Morgan, pela colaboração.

Aos colegas do Serviço de Imunologia e do Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-I (HUPES), pela amizade e parceria incondicional.

Aos funcionários do Serviço de Imunologia do Prof. Edgar M. Carvalho pela constante cooperação e disponibilidade.

Aos docentes, funcionários e colegas da pós graduação da UFBA pela enriquecedora e agradável convivência.

Agradecimentos especiais aos professores do PPGIM, Roberto Meyer e Songeli Menezes.

A bibliotecária da FIOCRUZ, Ana Maria Fiscina Sampaio, pela normalização desta dissertação.

A TODOS QUE, DIRETA OU INDIRETAMENTE CONTRIBUÍRAM NESTE ESTUDO,
MEU AGRADECIMENTO.

*“Se não procurares senão a recompensa,
o trabalho vai parecer-te penoso: mas se
apreciares o trabalho por si mesmo, nele
próprio terás sua recompensa”*

Tolstoi

SUMÁRIO

SIGLAS E ABREVIATURAS.....	12
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 HLV-I: HISTÓRICO.....	20
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	21
2.3 ESTRUTURA VIRAL E INTERAÇÃO COM O SISTEMAIMUNE.....	24
2.4 RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO PELO HTLV-I.....	28
2.5 DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-I E PATOGÊNESE DA HAM/TSP.....	30
2.6 INIBIDORES DE TNF- α	35
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 OBJETIVO GERAL.....	42
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 SELEÇÃO DE PACIENTES.....	43
4.2 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS.....	43
4.3 DESENHO DO ESTUDO.....	45
4.4 AMOSTRAGEM.....	45
4.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR.....	46
4.5.1 Separação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC).....	46
4.5.2 Curva dose-resposta com os inibidores de TNF- α	47
4.5.3 Viabilidade Celular.....	48
4.5.4 Dosagem das Citocinas.....	48
4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	50
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5 RESULTADOS.....	52
5.1 POPULAÇÃO ESTUDADA.....	52

TABELA 1.....	53
TABELA 2.....	55
5.2 COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO ESPONTÂNEA DAS CITOCINAS TNF- α E IFN- γ NOS GRUPOS ESTUDADOS.....	56
GRÁFICOS 1A E 1B.....	58
5.3 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DAS CITOCINAS TNF- α E IL-6 NO PLASMA.....	59
GRÁFICOS 2A E 2B.....	60
5.4 EFEITO INIBIDOR DAS DROGAS PENTOXIFILINA, FORSKOLIN, ROLIPRAM E TALIDOMIDA NA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS TNF- α E IFN- γ	61
TABELA 3.....	62
5.4.1 Pentoxifilina.....	63
GRÁFICOS 3A E 3B.....	64
5.4.2 Forskolin.....	65
GRÁFICOS 4A E 4B.....	66
5.4.3 Rolipram.....	67
GRÁFICOS 5A E 5B.....	68
5.4.4 Talidomida.....	69
GRÁFICOS 6A e 6B.....	70
6 DISCUSSÃO.....	71
7 CONCLUSÕES.....	79
8 PERSPECTIVAS.....	80
9 ABSTRACT.....	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
APÊNDICES:	
I - Termo de consentimento livre e esclarecido	
II – Questionário	
II – Escalas utilizadas	
Publicações (outras)	

Apresentações em Congressos

Ata de Aprovação

SIGLAS E ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígenos
ATL	Leucemia/linfoma de células T
AZT	Azathioprine
cAMP	Monofosfato de Adenosina cíclica
CD	Marcador de membrana celular (Cluster of differentiation)
CD-25	Marcador de células T, corresponde à cadeia alfa do receptor de IL-2 (IL-2R α)
EDSS	Escala de Incapacidade Funcional Ampliada
EIFES	Escala de Incapacidade Funcional por Sistemas
ELISA	Técnica de ensaio imunoenzimático (Enzime-Linked Immunosorbent Assay)
EM	Esclerose Múltipla
GLUT	Transportador de glicose (ubiquitous glucose transporter)
GM-CSF	Fator estimulante de colônia granulócito/macrófago
HAM/TSP	Mielopatia Associada ao HTLV-I/ Paraparesia Espástica Tropical
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Complexo gênico de antígenos leucocitários humanos
HLA- DR	Antígenos leucocitários humanos de classe II, DR
HTLV-I	Vírus T- linfotrópico humano tipo 1
HTLV-II	Vírus T- linfotrópico humano tipo 2
ICAM-I	Molécula de adesão intracelular- I
I κ B	Proteína inibidora de kinases
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-2R	Receptor de interleucina -2

IL-2R α	Receptor da cadeia alfa da interleucina -2
L- selectina	Molécula de adesão
LPS	Lipopolissacarídeos
LTR	Seqüências terminais repetitivas (long terminal repeats)
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal
mRNA	RNA mensageiro
NF- κ B	Fator de transcrição nuclear
NK	Células matadoras naturais (Natural Killer cells)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células Mononucleares do sangue periférico
RNA	Ácido ribonucléico
SNC	Sistema Nervoso Central
TCR	Receptor de células T
Th1	Linfócitos T auxiliares (TCD4 inflamatórios) do tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares (TCD4 auxiliares) do tipo 2
TGF- β	Fator de crescimento e transformação beta
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOOL	Receptor de sinalização para padrões moleculares de patógenos (TOOL LIKE RECEPTOR)
VLA-4	Molécula de adesão (antígeno leucocitário vascular)

RESUMO

EFEITO DE DROGAS INIBIDORAS DE TNF- α EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-I TÂNIA LUNA. O Retovírus HTLV-I é o agente etiológico da Mielopatia Associada ao HTLV-I/ Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), Leucemia de Células T do Adulto (ATL) e outras doenças sistêmicas mediadas pela resposta imune. A infecção pelo HTLV-I induz uma elevada proliferação espontânea das células T do perfil de citocinas com predominância das pró-inflamatórias. Nos indivíduos com HAM/TSP o TNF- α encontra-se elevado e envolvido na lesão tecidual. O surgimento de drogas inibidoras da síntese de TNF- α traz a possibilidade de uma terapêutica, buscando reduzir a inflamação e lesão tecidual. O objetivo deste estudo foi avaliar o poder inibidor destas drogas na produção de TNF- α em PBMC de indivíduos infectados com HTLV-I. PBMC de 37 indivíduos foram avaliados: assintomáticos (n=11), subclínicos (n=7) e com mielopatia (n=19). Foram utilizadas quatro drogas inibidoras da síntese de TNF- α : Pentoxifilina, Forskolin, Rolipram e Talidomida, as quais agem em diferentes etapas da síntese desta citocina. As concentrações espontâneas de TNF- α e IFN- γ e com as drogas inibidoras foram avaliados nos sobrenadantes das culturas de PBMC através da técnica de ELISA e os resultados comparados entre os grupos usando o teste Mann-Whitney. A produção espontânea de TNF- α foi mais elevada no grupo com HAM/TSP quando comparado ao assintomático e a diferença estatisticamente significativa ($p = 0.001$). A produção espontânea de IFN- γ também foi mais alta no grupo com HAM/TSP quando comparados aos assintomáticos e a diferença estatisticamente significativa ($p = 0.017$). Para avaliação das drogas inibidoras de TNF- α , utilizamos PBMC de indivíduos com de TNF- α e IFN- γ espontâneos maiores que 50 pg/ml e os resultados comparados pelo teste estatístico Wilcoxon signed ranks. Pentoxifilina foi utilizada nas doses de 50 e 200 μ M. A inibição da produção de TNF- α com 50 μ M foi de $71 \pm 26\%$ ($p = 0.003$) e de IFN- γ com 50 μ M foi de $46 \pm 24\%$ ($p = 0.001$). Forskolin foi utilizado nas doses de 50 e 200 μ M. A inibição de TNF- α com 50 μ M foi $77 \pm 25\%$ ($p = 0.003$) e de IFN- γ com 50 μ M foi $61 \pm 22\%$ ($p = 0.001$). Rolipram foi utilizado nas doses de 1, 0.1 e 0.01 μ M. O TNF- α foi inibido com 1 μ M em $80 \pm 22\%$ ($p = 0.007$) e o IFN- γ na dose mínima de 0.01 μ M em $47 \pm 20\%$ ($p = 0.002$). Talidomida foi utilizada nas doses de 1e 50 μ M. O TNF- α foi inibido com 1 μ M em $65 \pm 22\%$ ($p = 0.007$). A inibição sobre IFN- γ foi menor que 50% na dose máxima utilizada. Os dados mostram que as drogas testadas são capazes de suprimir a produção de TNF- α e IFN- γ e que a supressão é dose dependente. Também foram avaliadas as concentrações séricas das citocinas TNF- α e IL-6 em plasmas de 38 indivíduos infectados pelo HTLV-I. Destes, 18 tinham HAM/TSP e 20 eram assintomáticos. No grupo com HAM/TSP a média de TNF- α foi 7 ± 28 pg/ml; nos assintomáticos foi 6 ± 18 pg/ml. Em ambos os grupos só um resultado foi positivo, os outros não tiveram concentrações séricas detectáveis. A comparação entre grupos não foi estatisticamente significativa ($p = 0.840$, Mann-Whitney). No grupo com HAM/TSP a média de IL-6 foi 6 ± 14 pg/ml. A comparação entre grupos não foi estatisticamente significativa ($p = 0.721$, Mann-Whitney).

Palavras-chave: Vírus 1 linfotrópico T humano, Inibidores de TNF- α , TNF- α e IFN- γ .

ABSTRACT

EFFECT OF TNF- α INHIBITORS ON PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF HTLV-1- INFECTED INDIVIDUALS. TÂNIA LUNA.

The Human Lymphotropic Virus type I (HTLV-1) causes the HTLV-1 Associated Myelopathy Tropical Spastic Paraparesis (HAM TSP), Adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL) and other systemic illnesses that are mediated by the immune response. HTLV-I induces a spontaneous proliferation of T-cells and pro-inflammatory cytokines. In individuals with HAM/TSP, the levels of TNF- α are elevated and are involved in tissue damage. TNF- α inhibitors may reduce inflammation and tissue damage in HTLV-1 associated diseases. The aim of this study was to evaluate the inhibitory effect of these drugs in PBMCs of 3 groups of HTLV-1 infected individuals: asymptomatic and sub-clinical carriers and those with HAM/TSP. We tested four drugs with anti-TNF- α effect: Pentoxifilin, Forskolin, Rolipram and Thalidomide. The levels of TNF- α and IFN- γ were measured by the ELISA from supernatants of PBMC cultures without the addition of drugs (spontaneous) and after the addition of drugs. We used PBMCs from 37 infected individuals: HAM/TSP (n=19), sub-clinical group (n=7) and asymptomatic (n=11). To evaluate the spontaneous production of TNF- α and IFN- γ we used the Mann-Whitney test and the results were compared between groups: TNF- α was higher in the HAM/TSP group than asymptomatic group (p=0.001), HAM/TSP vs sub-clinical groups were not significant (p=0.75), sub-clinical vs asymptomatic individuals were significantly different (p=0.005) as was the spontaneous production of IFN- γ in the HAM/TSP and asymptomatic groups (p=0.017). To evaluate the effect of TNF- α inhibitors, PBMC from individuals with spontaneous TNF- α and IFN- γ production higher than 50 pg/ml were utilized. Wilcoxon signed ranks test was used to evaluate to compare groups. The doses of Pentoxifilin were 50 and 200 μ M. The inhibition of TNF- α with 50 μ M of Pentoxifilin was $71 \pm 26\%$ (p = 0.003), and the inhibition of IFN- γ production with 50 μ M was $46 \pm 24\%$ (p = 0.001). We used Forskolin in doses of 50 and 200 μ M. The inhibition of TNF- α production with 50 μ M was $77 \pm 25\%$ (p = 0.003). The inhibition of IFN- γ with 50 μ M was $61 \pm 22\%$ (p = 0.001). Rolipram was used in doses of 1, 0.1 and 0.01 μ M. The best inhibition of TNF- α production was achieved with 1 μ M of Rolipram, which inhibited $80 \pm 22\%$ (p = 0.007). Rolipram inhibited $47 \pm 20\%$ (p = 0.002) of the IFN- γ production with the minimal dose of 0.01 μ M. Doses of 1 and 50 μ M of Thalidomide were used. The 1 μ M dose inhibited TNF- α production by $65 \pm 22\%$ (p = 0.007). The inhibition of IFN- γ was less than 50% when the maximum dose was used. These results show that the drugs evaluated are able to suppress the production of TNF- α and IFN- γ and that this suppression is dose-dependent. This study also evaluated the serum levels of TNF- α and IL-6 in 38 HTLV-1 infected individuals, of which 18 had HAM/TSP and 20 were asymptomatic. The average of serum levels of TNF- α in the HAM/TSP group was 7 ± 28 pg/ml; and in the asymptomatic group was 6 ± 18 pg/ml. In both groups, only 1 result was positive, the others did not have detectable serum levels. The comparison between groups was not statistically significant (p = 0.840, Mann-Whitney). The average serum level of IL-6 in the HAM/TSP group was 6 ± 14 pg/ml. The comparison between groups was not statistically significant (p = 0.721, Mann-Whitney).

Keywords: Human T-cell lymphotropic Virus (HTLV-1), TNF- α Inhibitors, TNF- α and IFN- γ

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O Retrovirus HTLV-I é o agente etiológico da Mielopatia Associada ao HTLV-I / Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), da Leucemia/Linfoma de células T e doenças sistêmicas mediadas pela resposta imune (Gessain *et al.*, 1985; Jacobson S, 1996; Nagai & Jacobson, 2001). O HTLV-I apresenta distribuição mundial com aproximadamente 20 milhões de pessoas infectadas e características macro e micro epidemiológicas bem específicas: agrupados em áreas geograficamente (endêmico) definidas; soroprevalência variando com a região geográfica, grupo étnico e ou racial, população de risco e aumento com a idade (Edlich *et al.*, 2000; Mora, 2003).

No Brasil o HTLV-I tem grande importância epidemiológica sendo este considerado endêmico (Moreira ED, Jr. *et al.*, 1993), Salvador - Bahia registra uma das maiores taxas de soroprevalência do país, 1.35% em doadores de sangue (Galvão-Castro, 1997) e 1.76% na população geral (Dourado *et al.*, 2003). O HTLV-I pode causar diferentes doenças em indivíduos infectados, porém somente 5% desenvolve algum tipo de doença associada (Hollberg, 1997). Clínicamente as manifestações mais graves são a leucemia/linfoma de células T (ATL) (Poiesz *et al.*, 1980) e a HAM/TSP (Yoshida *et al.*, 1987).

O HTLV-I não é transmitido facilmente, sendo necessário o contato célula a célula, através dos linfócitos infectados a transmissão é mais eficiente. As principais vias de transmissão são: a vertical através do aleitamento materno; o contato sexual; transfusão de sangue e hemoderivados além do compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas (Araújo Ad, 1992a; Bittencourt, 1998).

Indivíduos infectados pelo HTLV-I têm proliferação espontânea dos linfócitos T, e perfil das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL-1 e IL-6 mais elevados. As citocinas têm funções importantes na imunorregulação afetando a proliferação e diferenciação celular levando a lesão tecidual. Vários estudos sugerem que esses achados imunológicos estão envolvidos na patogênese das doenças associadas ao HTLV-I como a HAM/TSP. (Kubota *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 2001; Suryaprasad & Prindiville, 2003).

A HAM/TSP é uma doença de progressão lenta, inflamatória e desmielinizante do SNC (Edlich *et al.*, 2000). Estudos histopatológicos do SNC demonstraram que a medula torácica é a mais afetada e que estas lesões estão associadas com infiltrações de linfócitos TCD4+, TCD8+ e macrófagos (Nagai & Jacobson, 2001). Pacientes com HAM/TSP têm títulos de anticorpos anti-HTLV-I elevados tanto no soro quanto no líquido (Osame *et al.*, 1986) e concentrações mais elevadas das citocinas IL-6 e TNF- α (Jacobson *et al.*, 1996; Macchi *et al.*, 1998).

Para que seja gerada uma resposta imune eficiente ao vírus muitas populações de células são necessárias, incluindo células T CD4+, CD8+, células dendríticas (DC), monócitos/macrófagos, além de outras. Embora a maioria dos estudos evidencie a importância dos linfócitos TCD8+ na patogênese da HAM/TSP (Nagai *et al.*, 2001; Barmak *et al.*, 2003), existem trabalhos sugerindo o relevante papel dos linfócitos TCD4+ na fase inicial da doença (Cabre *et al.*, 2000; Goon *et al.*, 2004a). Adicionalmente, a população de células TCD4+ tem sido descrita como a mais infectada pelo vírus e a que mais secreta citocinas pró-inflamatórias espontaneamente (Richardson *et al.*, 1990).

Pacientes com HAM/TSP apresentam um perfil de citocinas CD4+ Th1, com aumento de IFN- γ e TNF- α (Tandler *et al.*, 1991; Macchi *et al.*, 1998).

TNF- α é uma citocina proinflamatória produzida pelas células mononucleares que está envolvida na patogênese de doenças inflamatórias e autoimunes. Induz a expressão de moléculas de adesão e estimula a produção de enzimas proteolíticas (Krause *et al.*, 2003), além de ativar mecanismos microbicidas de células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos a produzir NO e O₂ os quais promovem a destruição da mielina. Estudos prévios sugerem que o TNF- α exerce efeito direto nos tecidos, estando envolvido na lesão tecidual de pacientes com HAM/TSP (Kubota *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2004).

Considerando-se que a resposta imune ao HTLV-I pode ter um papel na patogênese da HAM/TSP (Uchiyama, 1997), a imunoterapia com inibidores de TNF- α pode ser benéfica (Cabre *et al.*, 2000).

Na infecção pelo HTLV-I, a terapêutica anti-TNF- α tem sido bastante investigada, assim como em outras doenças. Os agentes anti-TNF- α podem ser classificados em três grupos que atuam na produção ou na atividade do TNF- α . No primeiro grupo, encontram-se os inibidores da síntese de TNF- α os quais são inibidores das fosfodiesterases (Pentoxifilina, Forskolina, Rolipram e Talidomida), no segundo grupo estão os inibidores do processamento da molécula e no terceiro estão os antagonistas dos receptores solúveis de TNF- α ou anticorpo anti-TNF- α , que inibe a ação da molécula já formada, (Eigler *et al.*, 1997).

O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito *in vitro* de drogas inibidoras de TNF- α em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-I com diagnóstico de HAM/TSP, HAM/TSP subclínica e portadores assintomáticos, comparando a produção das citocinas TNF- α e IFN- γ antes (espontâneo) e após o uso das drogas inibidoras. Estes resultados podem abrir perspectivas para um tratamento dessa condição baseado em imunomodulação, considerando que até o momento não existe um tratamento específico e eficaz para essa condição clínica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – HTLV-1 – HISTÓRICO

São reconhecidos 4 tipos de HTLV (I, II, III e IV). O HTLV-I e II são descritos como originários das linhagens STLV-I e II (simian T-lymphotropic vírus) respectivamente e apesar da origem distinta apresentam um alto grau de homologia (60%) na seqüência do genoma viral. O HTLV-III parece ser similar ao STLV-III. O HTLV-IV é membro de uma linhagem filogenética distinta de todos os HTLVs e STLVs conhecidos (Wolfe *et al.*, 2005). Contudo somente o HTLV-I está claramente associado a doenças no homem. O HTLV-I foi descrito em 1980 nos Estados Unidos. Pertence á família Retroviridae, subfamília Oncovirinae e ao gênero Deltaretrovirus. O HTLV-I foi o primeiro retrovírus descrito no homem; isolado inicialmente de um paciente com leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL), e posteriormente o primeiro retrovírus humano associado a doenças malignas (Poiesz *et al.*, 1980).

Em 1964, uma mielopatia torácica progressiva foi descrita na Jamaica em pacientes adultos, denominada de Paraparesia Espástica Tropical (TSP) (Montgomery *et al.*, 1964). Em 1985 a associação do HTLV-I com doenças neurológicas humanas foi descrita na Martinica em um estudo no qual 68% dos pacientes com TSP eram positivos para HTLV-I (Gessain *et al.*, 1985).

No mesmo ano, esses achados foram confirmados na Colômbia e Jamaica (Rodgers-Johnson *et al.*, 1985). Em 1986, no Japão, esse vírus foi relacionado com uma doença neurológica similar a TSP tendo sido denominada Mielopatia Associada ao HTLV-I (HAM) (Osame *et al.*, 1986). A comparação de características clínicas e laboratoriais mostrou que ambas eram a mesma doença, e o termo combinado HAM/TSP foi então adotado (Roman & Osame, 1988). Posteriormente o termo HAM/TSP foi designado

pela Organização Mundial de Saúde (OMS), para as principais formas clínicas das síndromes neurológicas associadas ao vírus HTLV-I (Araujo A de, 1992; Araújo Ad, 1992b).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A infecção pelo HTLV-I apresenta distribuição mundial com características epidemiológicas bastante específicas. A soroprevalência varia de forma significativa, com a região geográfica, o grupo étnico e ou racial e população de risco. É um vírus que assume grande importância epidemiológica, considerando-se a alta prevalência mundial, com cerca de 20 milhões de pessoas infectadas no mundo, a gravidade das manifestações clínicas, as características de transmissão e o caráter crônico da infecção, na qual em torno de 95% dos indivíduos infectados permanecem assintomáticos, facilitando a disseminação do vírus (Edlich *et al.*, 2000; Mora, 2003).

O HTLV-I é atualmente encontrado em muitas partes do mundo, sendo considerado endêmico no Sudeste do Japão, em diversas ilhas do Caribe (Jamaica, Martinica, Trindade, Haiti e Barbados), na África (Gabão, Nigéria, Guiné Bissau e Costa do Marfim), na Melanésia (Papua Nova Guiné, Austrália, Filipinas), nas Américas: Central e Sul (Panamá, Colômbia, Venezuela, Bolívia e Brasil) (Stuver *et al.*, 1992; Hollsberg, 1997; Carneiro-Proietti *et al.*, 2002).

Casos esporádicos têm sido relatados em áreas não endêmicas como Europa e América do Norte onde o vírus é encontrado somente entre imigrantes oriundos de áreas endêmicas e usuários de drogas injetáveis (Edlich *et al.*, 2000). No Brasil, a soroprevalência é muito variada e a cidade de Salvador, na Bahia registrou uma das mais altas taxas entre doadores de sangue (1.35%) (Galvão-Castro, 1997). Em outro estudo realizado em Salvador, de âmbito mais geral, a soroprevalência em pessoas

saudáveis foi de 1.8% e em pacientes hospitalizados no Serviço de doenças Infecciosas foi de 18.4% (Moreira ED, Jr. *et al.*, 1993). A soroprevalência também foi avaliada em quatro cidades do interior da Bahia: Jacobina, Catolândia, Ipujiara e Prado, com resultados gerais de 0.3%, embora esta houvesse variado de 0.0% em Prado a 0.7% em Jacobina (Brito,1998). Embora algumas justificativas tenham sido levantadas para explicar a prevalência mais elevada na capital do estado, são necessários mais estudos para um melhor esclarecimento. Em estudo mais recente de base populacional em Salvador, a prevalência na população geral foi 1.76%, variando entre os sexos, sendo 2% no feminino e 1.2% no masculino. Também neste trabalho foi citado aumento consistente em relação à idade chegando à prevalência a 10% em mulheres acima de 50 anos e 12% nos homens (Dourado *et al.*, 2003).

Apesar do HTLV-I apresentar alta estabilidade genética quando comparado a outros vírus RNA, em particular ao vírus da imunodeficiência humana (HIV), diferentes subtipos do HTLV-I foram isolados e bem caracterizados em diferentes áreas geográficas. Os primeiros estudos genéticos identificaram 3 grandes grupos filogenéticos: Cosmopolita (o mais difundido), Centro Africano e Melanésio. A maioria dos isolados de HTLV-I pertencentes aos dois últimos grupos foram encontrados em suas respectivas áreas geográficas, indicando forte correlação entre o genótipo viral e a origem geográfica dos seus portadores (Cabre *et al.*, 2000). Recentemente, análises mais detalhadas das seqüências terminais repetitivas - LTRs (long terminal repeats) do genoma viral, revelaram que o grupo Cosmopolita não é homogêneo, sendo então classificado em quatro subgrupos: Transcontinental ou grupo A, o qual se encontra distribuído em todo o mundo; Japonês ou grupo B, mais restrito a essa população; Oeste Africano ou grupo C, encontrado na Costa da África e Caribe; Norte Africano ou grupo D, encontrado no norte da África (Yamashita *et al.*, 1996).

No Brasil foram encontrados os quatro subgrupos predominando o grupo A. Entre os portadores assintomáticos foram encontrados os quatro subgrupos A, B, C e D, com prevalência respectivamente de 73.8%, 7.1%, 7.1% e 12%. Nos pacientes com HAM/TSP foram encontrados os subgrupos A, C e D com prevalência respectivamente de 89.3%, 7.1% e 3.6%, o subgrupo B não foi encontrado (Segurado *et al.*, 2002). Em estudo similar realizado em Salvador, o subgrupo Transcontinental ou A foi predominante (Alcântara Jr. *et al.*, 2003).

O HTLV-I não é transmitido facilmente, é necessário que haja contato célula a célula para que ocorra a invasão eficiente do vírus, sendo a via de transmissão mais eficaz através dos linfócitos infectados (Matsuoka, 2002).

A história natural da infecção pelo HTLV-I não está completamente elucidada, principalmente porque o tempo decorrido entre a exposição/infecção e o surgimento dos primeiros sintomas pode ser bastante longo, evidências indicam estar relacionado à via de transmissão. Em um estudo envolvendo 420 pacientes japoneses com diagnóstico de HAM/TSP, para os quais havia informações completas, 26% relataram história progressiva de transfusão de sangue. O intervalo médio entre a transfusão e o início dos sintomas foi estimado em quatro anos, período de latência considerado muito curto em relação a outras vias de transmissão (Sato & Okochi, 1986; Osame *et al.*, 1987).

Os mecanismos de transmissão reconhecidos para HTLV-I incluem: transmissão vertical especialmente no período pós-natal através do aleitamento materno, a transmissão intra-uterina ou perinatal acontece, mas parece ser menos freqüente (Hino *et al.*, 1985; Bittencourt, 1998); transmissão horizontal através de transfusões de sangue e uso de hemoderivados (Okochi *et al.*, 1984; Schreiber *et al.*, 1996); compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas (Robert-Guroff *et al.*, 1986); pelo contato sexual,

cuja transmissão é mais eficiente do homem para a mulher (Kajiyama *et al.*, 1986; Bittencourt, 1998).

A prevenção da doença deve focalizar a educação de uma forma geral, visando principalmente à população jovem, mães infectadas, doadores de sangue e usuários de drogas injetáveis (Carneiro-Proietti *et al.*, 2002).

Países como o Japão, que eliminaram ou reduziram a amamentação de mães infectadas, tiveram também redução nas taxas transmissão por essa via (Franchini & Streicher, 1995).

2.3 ESTRUTURA VIRAL E INTERAÇÃO COM O SISTEMA IMUNE

O HTLV-I é um retrovírus oncogênico com estrutura morfológica similar a outros retrovírus. Infecta vários tipos de células, porém tem atividades biológicas e patogênicas somente nas células T (Ye *et al.*, 2003). Apesar de infectar outras células, o HTLV-I tem tropismo para as células TCD4, porém os mecanismos moléculares que determinam esse tropismo, não são bem conhecidos (Richardson *et al.*, 1990; Ye *et al.*, 2003).

Os GLUTs (ubiquitous glucose transporter) são glicoproteínas integrais de membrana envolvidas no transporte da glicose na maioria das células, são reconhecidos 7 GLUTs (1 a 7). Recentemente o GLUT-1 foi identificado como receptor para o HTLV. Os GLUTs são regulados negativamente através da glicose. As perturbações no metabolismo da glicose seguindo-se de interações entre as glicoproteínas do envelope do HTLV com o GLUT-1 parecem contribuir para as doenças associadas ao HTLV (Manel *et al.*, 2003; Medina & Owen, 2002; Wertheimer *et al.*, 1991).

O vírus contém no seu envelope proteínas que se projetam para fora como a proteína transmembrana gp21 que atravessa o envelope e ancora a proteína de superfície gp46, a qual fica voltada para o exterior da partícula viral. A entrada do vírus na célula alvo

ocorre através da interação entre as glicoproteínas do envelope e o receptor GLUT-1 facilitando a fusão entre a partícula viral e a célula alvo (Delamarre *et al.*, 1996; Matsuoka, 2002). No centro dessa estrutura fica o capsídeo e o nucleocapsídeo que abriga no seu interior o genoma viral o qual é composto de duas cópias RNA de fita simples. O vírus possui 9.032 pares de bases flanqueadas por seqüências terminais repetitivas LTRs (long terminal repeats), situadas nas extremidades 5' e 3' do genoma viral. Essas seqüências são essenciais para a integração do DNA proviral dentro do DNA cromossômico do hospedeiro, e também na regulação transcricional do genoma do HTLV-I.

O genoma viral contém os genes estruturais gag, pol e env. O gene gag codifica as proteínas da matriz (p19), do capsídeo (p24) e do nucleocapsídeo (p15); o gene env codifica as proteínas do envelope (gp46 e 21); e o gene pol codifica as enzimas transcriptase reversa e a integrase. A transcriptase reversa é a enzima responsável pela transcrição do RNA viral em cDNA, o qual se integra ao genoma da célula hospedeira como provírus, fundamental portanto para a fase inicial do ciclo de replicação do retrovírus. É também responsável pela remoção da fita do RNA molde após a síntese da cadeia de DNA, degradando seletivamente o RNA da molécula híbrida DNA-RNA. A transcriptase reversa está presente no core da partícula viral, porém sua atividade se dá no citoplasma da célula hospedeira. A integrase é a enzima que dá prosseguimento ao ciclo de replicação do retrovírus após a síntese do DNA viral integrando-o no genoma da célula hospedeira. A protease é codificada pelo desvio de leitura das regiões gag e pol, é a enzima que atua sobre as cadeias poliprotéicas, clivando-as para a formação das proteínas estruturais maduras encontradas na partícula viral (Seiki *et al.*, 1983; Coffin, 1996). Entre as regiões env e a LTR 3' do genoma viral encontra-se a região *pX*, que codifica produtos gênicos, únicos do HTLV-I (tax e rex) e as proteínas p21 e p12. A

TAX (p40) é uma proteína transcricional importante na dinâmica do vírus, regulando a transcrição do genoma proviral indiretamente ao interagir com fatores de transcrição celulares e induzir sua ligação a sítios específicos na LTR do HTLV-I ativando sua transcrição. A TAX também interage com diferentes proteínas regulatórias celulares podendo induzir indiretamente a expressão de diversos genes celulares (Franchini, 1995; Ferreira *et al.*, 1997). Diversos estudos têm mostrado que a TAX induz o aumento da expressão de diferentes genes relacionados ao crescimento celular como os protooncogenes, fatores de crescimento ou seus receptores como IL-1, IL-2, IL-2R α , induzindo uma proliferação autônoma e desregulada dos linfócitos (Hollberg *et al.*, 1992; Wucherpfennig *et al.*, 1992; Richardson *et al.*, 1997; Hollberg, 1999). A TAX induz a produção de IL-6, (Kishimoto *et al.*, 1992a, b), o fator de crescimento e transformação beta (TGF- β), o fator estimulante de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), (Franchini, 1995; Franchini & Streicher, 1995; Ferreira *et al.*, 1997), IL-15 (Azimi *et al.*, 2001). A TAX ativa a transcrição do complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC-I) e interage com o fator de transcrição nuclear (NF- κ B) potencializando seus efeitos. O NF- κ B é encontrado no citoplasma, complexado com a proteína inibidora de kinases (I κ B), a TAX afeta a estabilidade desse complexo de duas formas: ligando-se ao I κ B liberando o NF- κ B que, livre desloca-se para o núcleo ou se liga ao NF- κ B no núcleo potencializando sua atividade transcricional (Kelly *et al.*, 1992; Sun *et al.*, 1994; Yoshida, 1996). A habilidade da proteína TAX de ativar o NF- κ B é essencial no papel de transformação pelo HTLV-I (Li & Gaynor, 1999). O potente desempenho transativador exercido pela proteína TAX tem um importante papel no processo de imortalização da célula através do NF- κ B (Grassmann *et al.*, 1992; Beraud & Greene, 1996). Tax também inibe a transcrição do gene que codifica a polimerase β , enzima envolvida no reparo do DNA inibindo a

apoptose (Grant *et al.*, 2002). A indução da transcrição de IL-15 também leva a imortalização da célula pois a IL-15 induz a proliferação linfocitária e protege a célula da apoptose (Azimi *et al.*, 2001). O HTLV-I utiliza vias de ativação que são insensíveis à ação supressora da citocina TGF- β a qual tem importante papel na supressão do crescimento de células tumorais (Hollberg *et al.*, 1994).

Em condições normais para que haja ativação das células T dois sinais são necessários, o primeiro é um sinal antígeno específico e dependente da interação entre o receptor de células T (TCR) e o MHC contendo o peptídeo antigênico; o segundo é o sinal co-estimulatório mediado pelas ligações entre as moléculas B7.1(CD80) ou B7.2 (CD86), presentes nas células apresentadoras de antígeno (APC) e a molécula CD28. As moléculas de B7.1 e B7.2 só são expressas nas APC após ativação por um patógeno (pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados ao patógeno – PAMP, por receptores específicos dessas moléculas como TOLL-LIKE e outros).

Os linfócitos infectados pelo HTLV-I expressam constitutivamente B7.1 e B7.2, sendo portanto indutores de resposta pela presença constante do sinal co-estimulatório envolvendo CD28 e B7.1/B7.2, favorecendo a ativação de células T, as quais então secretam citocinas (Lal *et al.*, 1996; Scholz *et al.*, 1996). Esse constante estado de ativação celular e a transcrição de citocinas pela TAX induz intensa proliferação celular, levando por sua vez à expressão de marcadores de ativação celular como CD25 e HLA-DR (Hollberg *et al.*, 1993; Macchi *et al.*, 1998); ausência de restrição ao HLA, (Popovic *et al.*, 1984); diminuição da apoptose (Grant *et al.*, 2002) e aumento da expressão de moléculas de adesão como ICAM-I, L-selectina e VLA-4 sobre as células infectadas, contribuindo para uma melhor ligação do vírus à célula hospedeira (Al-Fahim *et al.*, 1999; Cabre *et al.*, 1999; Stuyt *et al.*, 2003).

2.4 - RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO PELO HTLV-I

No curso normal de uma infecção, o agente infeccioso ativa a resposta imune inata seguida da adaptativa, que juntas eliminam a infecção e estabelecem uma imunidade protetora contra aquele agente. Na resposta imune aos vírus mecanismo semelhante é desenvolvido. O HTLV-I porém tem um complexo e preciso mecanismo regulador da replicação viral. Assim, os mecanismos de defesa da resposta imune inata, como a produção dos IFN tipo 1 (α e β) e lise celular mediada pelo complemento não são suficientes para controlar a replicação viral (Franchini & Streicher, 1995; Ferreira *et al.*, 1997).

A resposta imune humoral que segue a infecção pelo HTLV-I é caracterizada por intensa produção de anticorpos contra as proteínas estruturais do vírus, principalmente a glicoproteína gp46, que é encontrada na maioria dos indivíduos infectados (Jacobson *et al.*, 1991; Baba *et al.*, 1993). Esta proteína é responsável pelo reconhecimento do receptor celular e fusão peptídica (Rosenberg *et al.*, 1997; Sundaram *et al.*, 2004a). Apesar da forte resposta humoral, produzindo grandes quantidades de anticorpos contra a proteína gp46, estes não são capazes de impedir a fusão do vírus à célula hospedeira (Lairmore *et al.*, 1992).

A gp21 é também uma proteína do envelope do vírus que tem sua ação na inclusão do core viral no citoplasma da célula hospedeira, (Rosenberg *et al.*, 1997; Sundaram *et al.*, 2004b). Os anticorpos dirigidos contra a gp21 podem romper a fusão célula a célula através da redução dos sincícios (Sundaram *et al.*, 2004a; Sundaram *et al.*, 2004b).

A resposta imune celular é dependente da geração de células T auxiliares CD4+ e linfócitos T citotóxicos CD8+ (LTC) específicos contra peptídeos virais. Peptídeos do HTLV-I apresentados pelas moléculas HLA-I, ativam a geração de LTC, as quais lisam as células infectadas, enquanto os apresentados pelas HLA-II ativam a geração de

células T auxiliares CD4+ (Jeffery *et al.*, 1999). As TCD4 Th1 ativam macrófagos para que estes destruam patógenos intracelulares e as LTC através da lise destroem as células infectadas. As células T auxiliares Th1 ainda participam da produção de diversas citocinas, constituindo o perfil de células TCD4+ Th1 que produzem as citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), além de IL-1. As TCD Th2 ativam células B virgens, induzindo-as a produzir anticorpos.

Considera-se que apesar da resposta imune ao HTLV-I contribuir para proteção da infecção pelo vírus e para o controle das partículas virais, essa resposta pode ter um potencial papel patogênico no desenvolvimento de doenças associadas ao HTLV-I (Uchiyama, 1997).

2.5 DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-I E PATOGÊNESE DA HAM/TSP

O HTLV-I está associado a diferentes doenças em indivíduos infectados, porém somente 5% desenvolvem algum tipo de doença associada. Os sinais e sintomas destas patologias podem levar anos para surgir. A elevada frequência de indivíduos portadores assintomáticos em áreas endêmicas sugere que a infecção pelo HTLV-I não seja o único fator determinante para o desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-I, como a HAM/TSP e que haja a participação de co-fatores. Atualmente os mais investigados são: linhagem viral (Daenke *et al.*, 1990; Niewiesk *et al.*, 1994); HLA (Usuku *et al.*, 1988; Usuku *et al.*, 1990); carga viral (Richardson *et al.*, 1990); (Kubota *et al.*, 1994) e função imunológica (Levin & Jacobson, 1997), a qual depende da interação vírus-hospedeiro.

Clínicamente, as principais patologias associadas são a ATL e a HAM/TSP (Poiesz *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1982; Rodgers-Johnson *et al.*, 1985; Johnson *et al.*, 2001), além

de outras doenças como, polimiosite (Morgan *et al.*, 1989) dermatite infectiva (LaGrenade *et al.*, 1999; La Grenade *et al.*, 1998) e síndrome de Sjögren (Vernant, 1998).

Não é bem conhecido como o vírus causa essas diferentes doenças, porém a interação imunológica vírus-hospedeiro é considerada como importante causa de doença e a coexistência da carga proviral alta com células TCD4+ e TCD8+ específicas para HTLV-I constitui importante característica da HAM/TSP (Jacobson, S 1996; Johnson *et al.*, 2001; Nagai & Osame, 2003).

A HAM / TSP é uma doença inflamatória e desmielinizante do SNC (cuja patogênese é a mais estudada), geralmente insidiosa, podendo ser súbita, com características de progressão e cronicidade. A intensidade da reação inflamatória está relacionada com a duração da doença. Nos casos mais avançados ou de longa duração o processo de degeneração predomina sobre o da inflamação (Iwasaki, 1993). Segundo Kubota a HAM/TSP acomete menos de 1% dos indivíduos infectados (Kubota *et al.*, 2000), Yamano acha que esse percentual pode variar entre 0.25 e 3% (Yamano *et al.*, 2002). As principais manifestações clínicas da HAM/TSP são: paraparesia espástica crônica que progride geralmente de forma lenta, podendo permanecer estável, fraqueza e hiperreflexia dos membros inferiores, sinal de Babinski, sintomas sensitivos como formigamento, distúrbios vesical e intestinal, disfunção erétil e diminuição da libido (Araújo A, 1998).

Histopatologicamente a HAM/TSP é caracterizada por infiltração perivascular de células inflamatórias e desmielinização predominante na medula torácica (Nagai & Jacobson, 2001). Estudos histopatológicos do SNC de pacientes com HAM/TSP demonstraram que a região mais afetada foi a medula torácica (consistente com o quadro clínico), e que estas lesões estavam associadas com infiltrações (tanto na região

perivascular quanto parenquimal) de células TCD4+ e TCD8+, além de macrófagos e proliferação de astrócitos (Nagai et al., 2001; Nagai & Osame, 2003).

Foi observado maior número de células TCD8+ com o tempo de duração da doença (Cabre *et al.*, 1999). Citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF- α e IFN- γ também foram encontradas nos infiltrados perivasculares (Nagai & Jacobson, 2001).

A resposta imune no curso da infecção pelo HTLV-I pode apresentar-se de forma diferente nos pacientes que desenvolvem doenças associadas. Pacientes com HAM/TSP têm parâmetros humorais e celulares anormais quando comparados com portadores assintomáticos. Dentre as alterações descritas podemos citar: títulos de anticorpos anti-HTLV-I elevados no soro e líquido céfalo raquidiano (Kubota *et al.*, 1998), concentrações mais elevadas de IL-6 (Nishimoto *et al.*, 1990) e TNF- α (Jacobson *et al.*, 1996), além da diminuição da atividade das células NK (natural killer) (Feuer *et al.*, 1995) e da citotoxicidade celular dependente de anticorpos (Kitajima *et al.*, 1988). Contudo, a característica imunológica marcante, apresentada pelos pacientes que desenvolvem HAM/TSP é uma maior magnitude na resposta dos linfócitos ativados como a proliferação espontânea observada na ausência de antígenos exógenos e maior produção de TNF- α e IFN- γ quando comparados aos portadores assintomáticos (Sakai *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004). A proliferação espontânea observada em linfócitos de pacientes infectados pelo HTLV-I tem sido relacionada em parte ao IL-2 e seu receptor IL-2R α (Ijichi *et al.*, 1989). A adição de anticorpos monoclonais anti-IL-2 ou anti-IL-2R inibe parcialmente a proliferação celular (Tendler *et al.*, 1990), sugerindo o envolvimento de outro mecanismo nesse processo. A IL-15, uma citocina com características funcionais similares a IL-2, parece também participar dessa proliferação espontânea e contribuir para a manutenção da proliferação constante e redução da apoptose (Azimi *et al.*, 1999).

O HTLV-I desregula o sistema imune através da indução e secreção de citocinas, PBMCs de indivíduos infectados expressam níveis mais altos das citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α (Tendler *et al.*, 1991; Kubota *et al.*, 1998). Este desvio da resposta imune para um padrão de citocinas Th1 foi confirmado em estudo realizado com clones de células TCD4+ Th1 e Th2, nas quais após a infecção pelo vírus verificou-se que, as células Th1 mantiveram a produção de IFN- γ e as células Th2 substituíram a produção de IL-4 por IFN- γ (Macchi *et al.*, 1998).

Embora muitas populações celulares sejam ativadas durante a infecção pelo HTLV-I buscando desenvolver uma resposta eficiente contra o vírus, incluindo células TCD4+, TCD8+, dendríticas (DC), monócitos e macrófagos a maioria dos estudos realizados evidenciam a importância das TCD8+ na patogênese da HAM/TSP (Plumelle, 1999; Nagai *et al.*, 2001; Barmak *et al.*, 2003; Goon *et al.*, 2004b). Santos e colaboradores (2004), avaliando populações de células em pacientes com HAM/TSP, evidenciaram um aumento de células TCD4 e TCD8 produtoras de IFN- γ nesses pacientes sendo entretanto mais expressivo o aumento de células TCD8 ativadas (TCD8+, CD28 negativas), (Santos *et al.*, 2004).

As células TCD8+ CD28- foram descritas em outras doenças, a exemplo da doença de Chagas, onde há destruição acentuada do miocárdio desproporcional ao número de parasitos na lesão (Dutra *et al.*, 1996). Apesar da maioria dos estudos evidenciarem a importância das células TCD8+ na patogênese da HAM/TSP, existem trabalhos sugerindo o relevante papel das células TCD4+ na fase inicial da doença (Cabre *et al.*, 2000; Goon *et al.*, 2004a). Adicionalmente, a população de células TCD4+ tem sido descrita como a mais infectada pelo vírus e a que mais secreta citocinas pró-inflamatórias espontaneamente (Richardson *et al.*, 1990). O aumento da carga proviral tem sido relatado como um preditor para o desenvolvimento da HAM/TSP (Osame,

2002). Vários estudos têm mostrado que existe carga proviral mais elevada em pacientes com HAM/TSP que em portadores assintomáticos (Matsuzaki *et al.*, 2001; Yamano *et al.*, 2002; Bangham, 2003), embora esta possa flutuar durante o curso da doença (Takenouchi *et al.*, 2003).

Apesar da patogênese da HAM/TSP estar associada à intensa resposta imune, tanto humoral quanto celular (Osame, 2002), muitos passos ainda são necessários para um perfeito entendimento desse mecanismo.

Várias hipóteses tentam explicar o desenvolvimento da HAM/TSP, sendo três mais aceitas (Nagai *et al.*, 2001): citotóxica, “bystander” e autoimune. No modelo citotóxico, haveria um ataque citolítico, mediado por células TCD8+ contra as células gliais ou células TCD4+ infectadas pelo HTLV-I dentro do SNC. O modelo “bystander” (ou dano circunstancial) sugere que células TCD4+ infectadas migrariam para o SNC induzindo uma resposta imune com recrutamento de células TCD8+ e produção de citocinas inflamatórias, causando inflamação e dano tecidual. Estes dois modelos são superponíveis, em ambos a resposta imune é inicialmente dirigida contra as células infectadas, portanto contra antígenos virais, havendo posteriormente uma conseqüente inflamação e dano tecidual mediado pelas citocinas direcionadas contra as células infectadas. O modelo autoimune sugere que a infecção pelo HTLV-I provocaria a ativação de células TCD4+ autorreativas as quais migrariam para o SNC, resultando na produção de citocinas, inflamação e lesão tecidual. Este modelo prenuncia a ausência do vírus HTLV-I no SNC, sendo exclusivo dos linfócitos T. Entretanto esses modelos não são excludentes e podem ser responsáveis pela indução das lesões presentes na HAM/TSP. A conseqüência dessa resposta, seja esta dirigida contra proteínas do vírus ou por autoantígenos, é uma ativação da resposta imune com proliferação espontânea de linfócitos T e produção de citocinas, com predominância das pró-inflamatórias como

IFN- γ e TNF- α , as quais têm importantes funções na imunorregulação, proliferação, diferenciação celular e lesão tecidual. A produção de TNF- α bem como de outras citocinas inflamatórias servem para recrutar células inflamatórias e subsequente amplificação da resposta imune (Suryaprasad & Prindiville, 2003). A citocina TNF- α é produzida pelas PBMCs e está envolvida na patogênese de muitas doenças inflamatórias, auto-imunes, e lesão tecidual. O TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias, induz a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular, propiciando a passagem de células inflamatórias para os tecidos, estimulando a produção de enzimas proteolíticas (Krause *et al.*, 2003), além de ativar os mecanismos microbicidas de células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos com produção de NO e O₂, os quais promovem a destruição da mielina (Kubota *et al.*, 1998). Além disso, a citocina TNF- α e IL-6 exercem um efeito lesivo direto sobre os tecidos.

2.6 INIBIDORES DE TNF- α

O TNF- α foi purificado, seqüenciado e seu gene clonado em 1980 (Eigler *et al.*, 1997). Desde então muitas propriedades biológicas desta citocina têm sido demonstradas, em acréscimo as já conhecidas, como indução a caquexia e lise de células tumorais. Os efeitos do TNF- α parecem ser dose dependente. Em baixas concentrações age localmente como um regulador autócrino e parácrino dos leucócitos e células endoteliais, estimulando a expressão de ICAM-1 no endotélio vascular, proporcionando a passagem de células inflamatórias para os tecidos e estimulando fagócitos mononucleares a produzirem citocinas, inclusive IL-1, IL-6 e o próprio TNF- α . Além disso, o TNF- α funciona como um co-estimulador para a ativação de linfócitos T e para a produção de anticorpos pelos linfócitos B. Exerce efeito protetor contra certos vírus e

aumenta a expressão do MHC-I, potencializando a apresentação de antígenos e destruição de células infectadas. Quando o estímulo para a produção é intenso, quantidades maiores de citocina são produzidas e o TNF- α passa a agir de maneira sistêmica: 1- como pirogênio endógeno; 2 - ativando o sistema de coagulação; 3 - induzindo a caquexia; 4 - levando até mesmo a choque quando a quantidade liberada é muito grande.

A resposta biológica ao TNF- α é mediada pela ligação a receptores de superfície (TNF- α R) presentes em duas formas, p55 (RI) e p75 (RII), (Eigler *et al.*, 1997), que possuem domínios intracelulares semelhantes, porém diferem nos domínios extracelulares, bem como na sua distribuição tissular (Diez-Ruiz *et al.*, 1995; Vandenabeele *et al.*, 1995). As células epiteliais expressam principalmente o TNF- α RI enquanto o TNF- α RII predomina em células linfóides e monocíticas (Ryffel *et al.*, 1991), sendo que vários outros tipos celulares apresentam os dois receptores em proporções variáveis. Os receptores de TNF- α ao se desprenderem da superfície de células ativadas agem como reguladores da função desta citocina: 1- bloqueando a sua ação diretamente ou por competição com os receptores da superfície celular; 2 - atuando como proteínas carreadoras, levando o TNF- α para outros sítios que não o seu local de produção; 3 - estabilizando o TNF- α , retardando a taxa de dissociação da estrutura trimérica para sua forma monomérica inativa, prolongando a bioatividade desta citocina, (Diez-Ruiz *et al.*, 1995; Vandenabeele *et al.*, 1995).

A expressão de TNF- α é dependente da ativação da transcrição de fatores como o monofosfato de adenosina cíclica (cAMP) e NF κ B. A síntese de TNF- α pode ser suprimida através de inibidores das fosfodiesterases os quais inibem a degradação do cAMP e de prostanóides os quais ativam a adenilato ciclase via proteína G, elevando a

concentração intracelular do cAMP e o aumento deste leva a regulação negativa do NF- κ B (Kunkel *et al.*, 1988).

Os agentes anti-TNF- α podem ser classificados em três grupos atuando em dois diferentes estágios: produção (síntese e processamento) e atividade. No primeiro grupo encontram-se os inibidores da síntese, tais como inibidores das fosfodiesterases (Pentoxifilina, Rolipram, Forskolin e Talidomida). No segundo encontram-se os inibidores do processamento da molécula através das metalloproteases, impedindo sua clivagem e consequente transformação na forma monomérica. No terceiro grupo estão os inibidores do efeito ou antagonistas do TNF- α , como os receptores solúveis do TNF- α ou anticorpos anti-TNF- α , os quais inibem a ação da molécula já formada. A inibição da síntese de TNF- α pode ser realizada através de três mecanismos: 1- inibição da transcrição do mRNA; 2-inibição da meia vida do mRNA; 3- inibição da tradução. Entretanto algumas substâncias agem mais em um nível que em outro ou têm modo preferencial de ação (Eigler *et al.*, 1997; Konstantinos, 2000).

O modelo proposto de indução da lesão tecidual na HAM/TSP com produção de citocinas inflamatórias sugere que inibidores de TNF- α podem ser benéficos (Cabre *et al.*, 2000).

A terapêutica anti-TNF- α tem sido bastante investigada, não só na infecção pelo HTLV-I como em doenças infecciosas, inflamatórias e autoimunes. Esta terapêutica tem sido usada com sucesso no tratamento do eritema nodoso na hanseníase (Sampaio *et al.*, 1998; Sampaio *et al.*, 2002). Na artrite reumatóide (AR) e doença de Crohn (CD), diversos inibidores de TNF- α têm sido utilizados (Suryaprasad & Prindiville, 2003). Na leishmaniose mucosa também foram obtidos resultados eficazes nos casos refratários ao tratamento convencional (Lessa *et al.*, 2001). No lúpus eritematoso sistêmico (LES) e esclerose múltipla (EM) os resultados têm sido considerados promissores (Rieckmann *et*

al., 1996; Krause *et al.*, 2003). No entanto, a terapêutica anti-TNF- α tem melhor eficácia nas doenças autoimunes e inflamatórias que nas infecciosas (Eigler *et al.*, 1997).

A Pentoxifilina (PTX) é um derivado da metilxantina e um inibidor não específico das fosfodiesterases. PTX age inibindo a transcrição do mRNA do TNF- α e diminui significativamente a expressão da molécula de adesão Intracelular ICAM-I em monócitos humanos (Neuner *et al.*, 1994; Neuner *et al.*, 1997). PTX em combinação com dexametazona ou ciclosporina A, tem ação sinérgica sobre a inibição da produção de TNF- α (Han *et al.*, 1990; Funk *et al.*, 1995). Entre os inibidores das fosfodiesterases a PTX é a que tem sido clinicamente mais estudada principalmente em relação à supressão de TNF- α (Eigler *et al.*, 1997).

Culturas de PBMC de pacientes com HAM/TSP e portadores assintomáticos (grupo controle) foram acrescidas de PTX em doses variáveis. Os resultados mostraram supressão significativa e dose-dependente na produção das citocinas inflamatórias, TNF- α , IFN- γ e GM-CSF de pacientes com HAM/TSP quando comparados com os controles. PTX também diminuiu a expressão das moléculas de adesão LFA-1 e VLA-4 nas células TCD4+ e TCD8+ de pacientes com HAM/TSP e nos controles, apesar desta redução ter sido um pouco maior no grupo com HAM/TSP. A redução dessas moléculas foi maior na população de células TCD4+ de pacientes com HAM/TSP que nos controles (Tsujino *et al.*, 1997). O uso de PTX também em pacientes com HAM/TSP levou a uma diminuição da proliferação celular e melhora motora (Shirabe *et al.*, 1997). A avaliação do perfil de citocinas em pacientes com HAM/TSP, antes e depois do uso de PTX, mostrou uma modulação do perfil da resposta imune Th1 com supressão de IFN- γ e indução da resposta Th2 com produção de IL-4 e IL-10 (Fujimoto *et al.*, 1999).

O tratamento do eritema nodoso na hanseníase com PTX diminuiu as concentrações de TNF- α em PBMC de pacientes tratados (Sampaio *et al.*, 1998).

É importante salientar que a PTX não reduz o TNF- α abaixo das concentrações basais encontrados nos indivíduos normais. Esse fato é de fundamental importância uma vez que o TNF- α , em concentrações fisiológicas é essencial para o sistema imune, tendo efeito protetor contra agentes infecciosos intracelulares (Beutler & Cerami, 1987).

Forskolin (FK) também inibidor inespecífico da fosfodiesterases cujo mecanismo de ação é o mesmo de PTX, inibe a degradação do cAMP com conseqüente elevação da concentração deste (Gantner *et al.*, 1997).

Rolipram (ROL) é um inibidor específico da fosfodiesterases, inibe mRNA do TNF- α a nível pós transcricional. Existem evidências que sua ação é 500 vezes mais potente que a da PTX na supressão da síntese do TNF- α (Eigler *et al.*, 1997; Bielekova *et al.*, 2000).

Muitos trabalhos evidenciam o efeito inibidor de ROL sobre a produção de TNF- α em diversas doenças como: na colite experimental em ratos BALB/c (Hartmann *et al.*, 2000); também na glomerulonefrite, ratos foram usados como modelo experimental (Tam *et al.*, 2000); na esclerose múltipla, PBMCs foram cultivados na presença e ausência de autoantígenos órgão específico com e sem ROL. A expressão de TNF- α e IFN- γ foram reduzidas, porém as citocinas Th2 como IL-4, IL-10 e TGF- β não foram afetadas (Navikas *et al.*, 1998); também na artrite reumatóide, foram usados ratos como modelo experimental (Ross *et al.*, 1997). O efeito do ROL também foi avaliado em PBMCs de pacientes com HAM/TSP para verificação das concentrações das citocinas TNF- α , IFN- γ e TGF- β . As células foram cultivadas com diferentes doses de ROL e PTX, células de linhagens foram usadas nas mesmas condições para efeito de comparação. Os resultados mostraram um efeito redutor das concentrações de TNF- α e IFN- γ em ambos os tipos de células, porém as concentrações de TGF- β não foram

afetadas pelo ROL. Os resultados deste estudo indicaram a possibilidade de uma terapêutica benéfica com esta droga (Hatae *et al.*, 1997). Em outro trabalho realizado com o inibidor ROL foi verificado que, este além de aumentar o cAMP suprimindo TNF- α , aumentou a síntese de IL-10 (Eigler *et al.*, 1998).

A Talidomida (TAL), após 40 anos em desuso devido aos seus efeitos teratogênicos, ressurge como uma droga com efeitos imunomodulatórios e anti-inflamatórios efetivos e tem sido testada em diversas condições que cursam com alterações do sistema imune. É um derivado sintético do ácido glutâmico que age inibindo a síntese de TNF- α , aumentando a degradação do mRNA do TNF- α em macrófagos, com conseqüente inibição da produção desta citocina (Moreira AL *et al.*, 1993; Sandborn & Targan, 2002). A TAL tem sido relatada na literatura como uma droga com potencial terapêutico em diversas condições clínicas, embora não seja considerada um bom inibidor de TNF- α *in vitro* (Marriott *et al.*, 1999). Na hanseníase tipo II, onde se detecta concentrações elevadas de TNF- α , o tratamento com talidomida teve resultados considerados promissores (Parida & Grau, 1993; Sampaio *et al.*, 1993).

Atualmente têm sido mais usados os análogos da talidomida cujos componentes não têm efeito teratogênicos. Recentemente, o eritema nodoso na hanseníase foi tratado com um análogo de talidomida e o resultado foi considerado promissor (Sampaio *et al.*, 1993; Sampaio *et al.*, 2002).

Embora uma quantidade relativamente grande de informações tenha sido acumulada nas últimas duas décadas a cerca dos aspectos epidemiológicos, imunológicos, virológicos, moleculares e clínicos da HAM/TSP, ainda existe uma lacuna em relação ao desenvolvimento de uma terapêutica satisfatória no tratamento desta patologia. Diferentes drogas já foram testadas, os efeitos limitados e pouco duradouros são pontos de interseção em quase todas as formas de tratamento.

O tratamento da HAM/TSP utilizado atualmente consiste de: plasmaferese (Matsuo *et al.*, 1988; Osame, 1990); corticosteróides como prednisolona (Osame, 1990); gamaglobulina em altas doses (Kuroda *et al.*, 1991); IFN- α (Shibayama *et al.*, 1991; Kuroda *et al.*, 1992); zidovudina (Azathioprine-AZT) (Gout *et al.*, 1991; Sheremata *et al.*, 1993); pentoxifilina (Shirabe *et al.*, 1997); além de vitamina C em altas doses (Kataoka *et al.*, 1993). Nakagawa em 1996 avaliou a experiência acumulada no tratamento de 200 pacientes com HAM/TSP constatando os melhores resultados com: predisolona oral (69.5%); plasmaferese (43.8%); metilprednisolona endovenosa (30%); IFN- α (23%); vitamina C (20%). (Nakagawa *et al.*, 1996).

Os trabalhos até agora publicados não permitem uma conclusão definitiva sobre o melhor procedimento terapêutico na HAM/TSP. Nenhum deles preenche totalmente os requisitos de um estudo ideal: controlado, randomizado, duplo-cego, número expressivo de casos e um período prolongado de seguimento evolutivo pós-tratamento. Contudo, apesar dos resultados destes estudos não serem conclusivos, as avaliações prévias podem ser úteis para um planejamento mais adequado dos futuros protocolos terapêuticos. Na maioria dos estudos, os melhores resultados obtidos foram em pacientes com menor grau de comprometimento neurológico e menor duração do quadro clínico (Araújo AQC, 1995).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de drogas inibidoras de TNF- α sobre a produção espontânea de citocinas produzidas por PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-I.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Comparar a produção espontânea de TNF- α e IFN- γ em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-I assintomáticos ou com diferentes graus de doença neurológica.

3.1.2 Comparar as concentrações séricas de TNF- α e IL-6 no plasma de pacientes infectados pelo HTLV-I assintomáticos e com HAM/TSP.

3.1.3 Avaliar os efeitos dos inibidores de TNF- α sobre a produção espontânea de TNF- α e IFN- γ em indivíduos infectados pelo HTLV-I.

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DE PACIENTES

Os participantes deste estudo foram oriundos dos Bancos de Sangue STS (Serviço de Transfusão de Sangue), HEMOBA (Hemocentro da Bahia) e Ambulatório de Neurologia do HUPES (Hospital Universitário Professor Edgard Santos), sendo acompanhados no Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-I / II do HUPES.

O diagnóstico sorológico da infecção foi estabelecido pelo teste ELISA (Cambridge Biotech Corp. Worcest, MA, USA) e confirmado pela análise do Western Blot, (HTLV-I blot 2.4, Genelab Singapore). Os indivíduos com resultados positivos foram encaminhados para o Ambulatório Multidisciplinar de HTLV-I/II.

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice-1), foram avaliados através de um questionário clínico-epidemiológico padronizado (Apêndice-2), além de exame clínico e neurológico. Para o exame neurológico foram utilizadas as escalas: EIFES, EDSS e OSAME (Apêndice-3). Com o auxílio dessas escalas, os pacientes foram classificados em: HAM/TSP, HAM/TSP subclínico e portadores assintomáticos.

4.2 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS

Para diagnóstico e classificação da HAM/TSP foram utilizadas as escalas de OSAME (Izumo, *et al.*, 1996) e EDSS (Kurtzke, 1983).

A escala de OSAME que avalia a capacidade motora estratifica os indivíduos em 2 subgrupos distintos (graus 0 a 13):

Subgrupo I – Grau 0 ou assintomáticos

Subgrupo II – Graus 1 a 13, compreendido dos indivíduos subclínicos e com HAM/TSP.

A escala EDSS (graus 0 a 10), estabelece se a limitação motora do paciente é determinada por uma alteração neurológica e o diagnóstico clínico da HAM/TSP através do estudo dos sistemas funcionais.

No ambulatório Multidisciplinar de HTLV-I os indivíduos infectados pelo HTLV-I são classificados em 3 grupos como descritos abaixo:

1º - Assintomáticos – Indivíduos infectados pelo HTLV-I: EDSS = 0 e OSAME = 0 e sem sintomas clínicos detectáveis.

2º- Subclínicos - Indivíduos infectados pelo HTLV-I: EDSS \leq 2 e OSAME =0. Esse grupo também é denominado de portadores de Mielopatia subclínica. Representam uma fase inicial da doença, podendo apresentar sintomas miccionais (manifestações mais precoce da doença), disfunção erétil, diminuição da libido e da sensibilidade vibratória. O estudo de Castro relata alta prevalência de disfunção erétil associada à ocorrência de sintomas urinários em indivíduos com EDSS entre 0.5 e 1.5 (Castro *et al.*, 2005).

3º- HAM/TSP - pacientes com mielopatia clinicamente definida associada ao HTLV-I: EDSS \geq 2 e OSAME \geq 1.

O diagnóstico de HAM/TSP foi baseado nos critérios da OMS (1990).

4º - Controles - Voluntários com sorologia negativa para HTLV-I.

Os seguintes critérios de inclusão e exclusão foram estabelecidos para seleção dos pacientes:

A – Critérios de Inclusão

- Pacientes de ambos os sexos e todas as idades;
- Diagnóstico confirmado por Western Blot de infecção por HTLV-I;

B – Critérios de Exclusão

- Portadores de outras doenças com limitação funcional que pudesse interferir no exame neurológico;
- Co-infecção;
- Uso de drogas imunossupressoras nos últimos 90 dias da avaliação;
- Diagnóstico de alguma doença imunossupressora ou gravidez.

4.3 DESENHO DO ESTUDO

Estudo de corte transversal comparando a resposta imune de grupos de pacientes infectados por HTLV-I assintomáticos ou com diferentes graus de gravidade de HAM/TSP, aninhado a estudo experimental avaliando o efeito de drogas inibidoras de TNF- α nas células mononucleares desses pacientes.

4.4 AMOSTRAGEM

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, foram selecionados (amostra de conviniência) 75 indivíduos para fazer parte do estudo. No qual foram incluídos 7 controles (voluntários), com sorologia negativa para HTLV-I.

Destes, foram utilizados PBMC de 37 indivíduos, sendo: 11 assintomáticos, 7 subclínicos e 19 portadores de HAM/TSP para avaliação da produção espontânea de TNF- α e IFN- γ e inibição da produção após o uso de drogas supressoras de TNF- α . Nos demais, 20 assintomáticos e 18 portadores de HAM/TSP (n=38) foram avaliadas as concentrações séricas de TNF- α e IL-6.

4.5 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CELULAR

A avaliação da resposta imune celular foi feita utilizando PBMC, obtido de amostras de sangue heparinizado (100 UI) colhido em veia periférica. Esta avaliação constou de dosagens da produção espontânea das citocinas TNF- α e IFN- γ (sem estímulo) e após adição de diferentes concentrações de drogas inibidoras de TNF- α : Pentoxifilina, Forskolim, Rolipram e Talidomida, em concentrações previamente determinadas em uma curva dose-resposta.

A avaliação foi realizada nos 3 grupos do estudo (sem estímulo), e controles nos quais as células foram estimuladas com Fitohemaglutinina (PHA) na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ para induzir proliferação celular e produção de citocinas e possibilitando a avaliação do efeito das drogas inibidoras.

4.5.1 Separação de PBMC

O sangue heparinizado (30 ml) era diluído 1:2 em salina a 0.9% e colocado sobre um gradiente de Ficoll-Hypaque Research Grade (Pharmacia Biotech, USA) na proporção de 3 ml para cada 10 ml de sangue. Após centrifugação a 1.450 rpm (800g) por 35 minutos, o anel de células formado na interfase era aspirado e estas células lavadas 3 vezes com salina a 0.9%, centrifugadas a 1.200 rpm por 10 min. Após contagem de células em câmara de *Newbauer* em diluição de 1/10 em azul de Trypan, estas células eram ressuspensas em RPMI (RPMI 1640, Gibico Laboratories, Grand Island, NY, USA), a uma concentração de 3×10^6 células/ml e o meio suplementado com 10% de soro AB sendo então cultivadas em placas de 24 poços para culturas de células (Falcon, Becton Dickinson e Company, New Jersey, USA). Estas culturas eram incubadas por 72 horas à 37°C em estufa umidificada, com 5% de CO₂. Após esse período, os sobrenadantes eram coletados e estocados a -20°C para posterior avaliação da produção espontânea das citocinas TNF- α , IFN- γ , e ação dos inibidores na produção destas

citocinas. Essas determinações foram feitas através da técnica de ELISA *sandwich* como descrita no item 4.5.4.

4.5.2 Curva dose-resposta com os inibidores de TNF- α

Para avaliarmos a menor dose capaz de suprimir acima de 50% a produção espontânea, mantendo a viabilidade celular acima de 80%, estabelecemos uma curva dose-resposta, com 5 diferentes concentrações de cada uma das drogas: 1 μ M - 10 μ M - 50 μ M - 100 μ M e 200 μ M para as drogas Pentoxifilina (PTX), Forskolin (FK) e Talidomida (TAL) e de 0.01, 0.1, 1, 10 e 100 μ M para Rolipram (ROL). Foram utilizados PBMC de 4 pacientes com HAM/TSP e 1 controle.

Após análise dos resultados foram realizados os experimentos utilizando as drogas nas seguintes concentrações:

PTX - 50 e 200 μ M

FK - 50 e 200 μ M

RL - 0.01, 0.1, 1 μ M

TAL - 1 e 50 μ M

4.5.3 Viabilidade Celular

O teste da viabilidade celular foi realizado pelo método de exclusão do azul de Trypan (STROBER, 1991), nas células de 3 pacientes com HAM/TSP e 3 indivíduos controles, negativos para HTLV-I. Após as 72 horas de incubação com as drogas inibidoras de TNF- α , os sobrenadantes das culturas foram colhidos e devidamente acondicionados em freezer. A camada celular presente no fundo de cada poço, correspondendo as drogas em testes nas diversas doses, e no poço contendo só o meio (produção espontânea), foi suspensa em 1ml de PBS e as células corados com azul de Trypan numa diluição de 1/2, retirando-se uma alíquota da suspensão de 1ml e incubando por 3 a 5 minutos em temperatura ambiente. As células eram em seguida homogeneizadas e colocadas em

câmara de Neubauer procedendo à contagem das células viáveis e não viáveis, (Strober, 1991).

4.5.4 Dosagem das Citocinas

Após incubação por 72 horas, os sobrenadantes das culturas em PBMC foram colhidos e as concentrações de TNF- α e IFN- γ foram dosados através da técnica de ELISA *sanduíche*, utilizando-se reagentes comercialmente vendidos e segundo métodos previamente descritos (Santos *et al.*, 2004).

Para as dosagens de TNF- α foi utilizado o DuoSet da Genzyme (Genzyme Diagnostics, Cambridge, Ma, USA) e placas Immulon 2 (Dynatech Laboratorios, Inc., USA). Para a dosagem de IFN- γ foi usado o DuoSet da Phar-Migen (Phar-Migen, San Diego, CA, USA) e placas NUNC Maxisorp (Nalgene Nunc internacional, Dinmark). Descrevendo brevemente a técnica, as placas foram sensibilizadas com anticorpo anti-citocina, após lavagem e bloqueio com PBS com 0.05% de Tween 20 e 4% de BSA, os sobrenadantes (100 μ l/poço) foram adicionados à placa e incubados durante a noite a 4° C. Após lavagem com PBS/T 0.05% por 5 vezes, um segundo anticorpo marcado com biotina foi adicionado, seguido de conjugado Streptavidina-Peroxidase. A reação foi revelada com uma solução de substrato enzimático (TMB) usada na ELISA para detectar a peroxidase ligada nos anticorpos e interrompida com uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) após 20 minutos, seguida de leitura da densidade óptica em espectômetro a 450nm. Os resultados foram expressos em pg/ml por interpolação das densidades ópticas obtidas em curva-padrão, utilizando-se as citocinas recombinantes, diluídas em meio utilizado nas culturas para PBMC.

As citocinas TNF- α e IL-6 também foram dosadas no plasma (os quais foram aliquotados e estocados em freezer a - 20° C) pela técnica ELISA, utilizando-se o kit da

R& D System (Quantikine HS, R & D Systems Inc. Minneapolis, USA), seguindo-se orientações técnicas do fornecedor.

4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto dessa pesquisa foi aprovado pelo comitê de Ética Médica do Hospital Universitário Professor Edgard Santos. Termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos pacientes ou responsáveis dos menores de 18 anos. Todas as coletas e manuseio de materiais biológicos dos pacientes foram realizados utilizando-se medidas de segurança padronizadas. O médico (pesquisador) que avaliou os pacientes esteve sempre à disposição dos mesmos para esclarecimento e acompanhamento, bem como outros médicos que davam suporte em outras especialidades. Todos os pacientes foram beneficiados com acompanhamento ambulatorial gratuito, com tratamento de complicações da doença, além de suporte no diagnóstico e tratamento de outras doenças que pudessem melhorar a qualidade de vida dos mesmos. O cadastramento dos pacientes viabiliza o contato com os familiares dos mesmos, em caso de surgimento de um tratamento futuro, o que é uma busca constante no atual momento.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram calculados, média, mediana e desvio padrão (DP) dos dados demográficos e imunológicos de todos os indivíduos avaliados. As diferenças nas concentrações das citocinas TNF- α e IFN- γ produzidas por PBMC dos três grupos em estudo foram comparadas dois a dois através do Teste não Paramétrico e não Pareado de Mann-Whitney, utilizando-se o programa Instat, desde que estes dados biológicos não têm distribuição normal.

As concentrações séricas das citocinas TNF- α e IL-6, dosadas nos plasmas de indivíduos HTLV-I positivos nos dois grupos em estudo (HAM/TSP e assintomáticos) também foram avaliadas pelo Teste de Mann-Whitney para verificar se havia diferença nas concentrações séricas destas citocinas nestes grupos.

Para a análise comparativa da produção espontânea das citocinas TNF- α e IFN- γ em sobrenadantes de culturas de PBMC e com as drogas inibidoras foi utilizado o Teste não Paramétrico Pareado de Wilcoxon signed-ranks, sendo este indicado por tratar-se de comparação das mesmas células, com e sem as drogas em teste.

5 RESULTADOS

5.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Para o estudo de ação das drogas foram avaliados 37 indivíduos infectados pelo HTLV-I representando os três grupos classificados: 19 com HAM/TSP, 7 subclínicos e 11 assintomáticos.

Como mostra a tabela 1 no grupo com HAM/TSP, a relação entre os gêneros masculino e feminino foi de 10 para 9 e a idade variou de 38 a 75 anos com média \pm DP de 53 ± 11 . Nos subclínicos a relação entre os gêneros masculino e feminino foi de 3 para 4 e a idade variou de 27 a 47 anos com média \pm DP de 37 ± 08 . Nos assintomáticos a relação entre gêneros masculino e feminino foi de 3 para 8, a idade variou de 34 a 66 anos com média \pm DP de 51 ± 09 .

Os escores de acordo as escalas EDSS e OSAME que foram utilizadas para a classificação dos pacientes infectados pelo HTLV-I nos grupos estudados foram: no grupo com HAM/TSP o EDSS apresentou média \pm DP de 4.5 ± 1.8 , variando de 2.5 a 8 e OSAME média \pm DP de $4. \pm 1.9$, variando de 1 a 10. O grupo de subclínicos o EDSS teve média \pm DP de 1.5 ± 0.2 , variando de 1 a 1.5, sendo nesse grupo todos os indivíduos OSAME = 0.

Embora as concentrações de TNF- α e IFN- γ fossem mais elevadas no grupo com HAM/TSP em relação aos subclínicos e assintomáticos, houve uma grande variabilidade nas concentrações dessas citocinas nos indivíduos infectados pelo HTLV-I. (**Tabela 1**).

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e imunológicas dos indivíduos Infectados pelo HTLV-I assintomáticos ou com diferentes graus de disfunção neurológica.

Grupos Estudados			
Características	HAM/TSP (n=19)	Subclínicos^b (n =07)	Assintomáticos^c (n=11)
Relação M:F	10:9	2:4	3:8
Idade (variação)	53 ± 11 (38 – 75)	37±08 (27 – 47)	51 ± 09 (34 – 66)
EDSS (variação)	4.5 ± 1.8 2.5 a 8.0	1.5 ± 0.2 1.0 a 1.5	0
OSAME (variação)	4 ± 1.9 1 a 10	0	0
IFN- γ espontâneo (pg/ml) (variação)	513 ± 650 ^d (0 – 1877)	331 ± 723 (0 – 1950)	112 ± 203 ^d (0 – 565)
TNF- α espontâneo (pg/ml) (variação)	332 ± 423 ^e (0 – 1334)	283 ± 400 ^f (11 – 926)	33 ± 90 ^{e,f} (0 – 298)

a - EDSS ≥ 2 e OSAME ≥ 1 ; b - EDSS < 2 e OSAME = 0; c -EDSS = 0 e OSAME = 0

d - p = 0.0170; e - p = 0.0012; f - p = 0.0059 (Para comparação dos grupos foi usado o teste de Mann-Whitney)

Controles Negativos: TNF- α = 134 ± 46 (variação 88 -180) e IFN - γ = 27 ± 26 (variação 1 - 53).

Para quantificação de TNF- α e IL-6 no plasma foram avaliados 38 indivíduos infectados pelo HTLV-I, 18 com HAM/TSP e 20 assintomáticos. Para essa avaliação foram incluídos 4 controles não infectados pelo HTLV-I, os quais foram usados para estabelecer o cut-off para estas citocinas: TNF- α = 0 e IL-6 = 3.6.

No grupo com HAM/TSP, a relação entre os gêneros masculino e feminino foi de 8 para 10 e a idade variou de 15 a 74 anos e média \pm DP 48 \pm 20.

No grupo de assintomáticos a relação entre os gêneros masculino e feminino foi de 9 para 11, a idade variou de 15 a 66 anos com média \pm DP 49 \pm 15 (**Tabela 2**).

Tabela 2. Características demográficas e avaliação das concentrações plasmáticas de TNF- α e IL-6 em indivíduos infectados HTLV-I assintomáticos e com HAM/TSP.

Grupos Estudados

Características	HAM/TSP (n=18)	Assintomáticos (n=20)	Mann-Whitney
Relação M : F	8:10	9:11	-
Idade	48 \pm 20	49 \pm 15	-
(Variação)	(74 – 15)	(66 – 15)	
Concentração de TNF- α (pg/ml)	7 \pm 28	6 \pm 18	^a p = 0.840
(Variação)	(0 – 121)	(0 – 74)	
Concentração de IL-6 (pg/ml)	6 \pm 14	7 \pm 20	^a p = 0.721
(Variação)	(0 – 60)	(0 – 87)	

^a Mann-Whitney (Cut-off: TNF- α = 0 pg/ml e IL-6 = 3.6 pg/ml).

5.2 COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO ESPONTÂNEA DAS CITOCINAS TNF- α E IFN- γ

A avaliação da produção espontânea das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ foi feita nos três grupos do estudo.

A produção de TNF- α no grupo com HAM/TSP variou de 0 a 1.334 pg/ml, com média \pm DP de 332 ± 423 pg/ml. No grupo de subclínicos, a variação dessa produção foi de 11 a 926 pg/ml, sendo a média \pm DP de 283 ± 400 pg/ml. No grupo de assintomáticos, a produção variou de 0 a 298 pg/ml, com média \pm DP de 33 ± 90 pg/ml (Tabela 1).

A comparação entre os três grupos (dois a dois) mostra que a produção espontânea de TNF- α no grupo com HAM/TSP em relação ao grupo de assintomáticos foi significativamente maior ($p = 0.001$), porém em relação ao grupo de subclínicos não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0.750$). O grupo de subclínicos também apresentou produção de TNF- α maior que o grupo de assintomáticos ($p = 0.005$) (**Gráfico 1A**).

A produção de IFN- γ no grupo com HAM/TSP variou de 0 a 1.877 pg/ml, sendo a média \pm DP de 513 ± 650 pg/ml. No grupo de subclínicos a produção variou de 0 a 1.950 pg/ml, com média \pm DP de 331 ± 723 pg/ml. Nos assintomáticos essa variação foi de 0 a 565 pg/ml, com média \pm DP de 112 ± 203 pg/ml (Tabela 1).

A comparação entre os 3 grupos (dois a dois) mostra que a produção espontânea de IFN- γ no grupo com HAM/TSP foi significativamente maior em relação ao grupo de assintomáticos ($p = 0.017$). Entretanto, não houve diferença significativa na produção de IFN- γ entre o grupo com HAM/TSP e o grupo de subclínicos ($p = 0.193$) nem entre o grupo de subclínicos e o grupo de assintomáticos ($p = 0.466$) (**Gráfico 1B**).

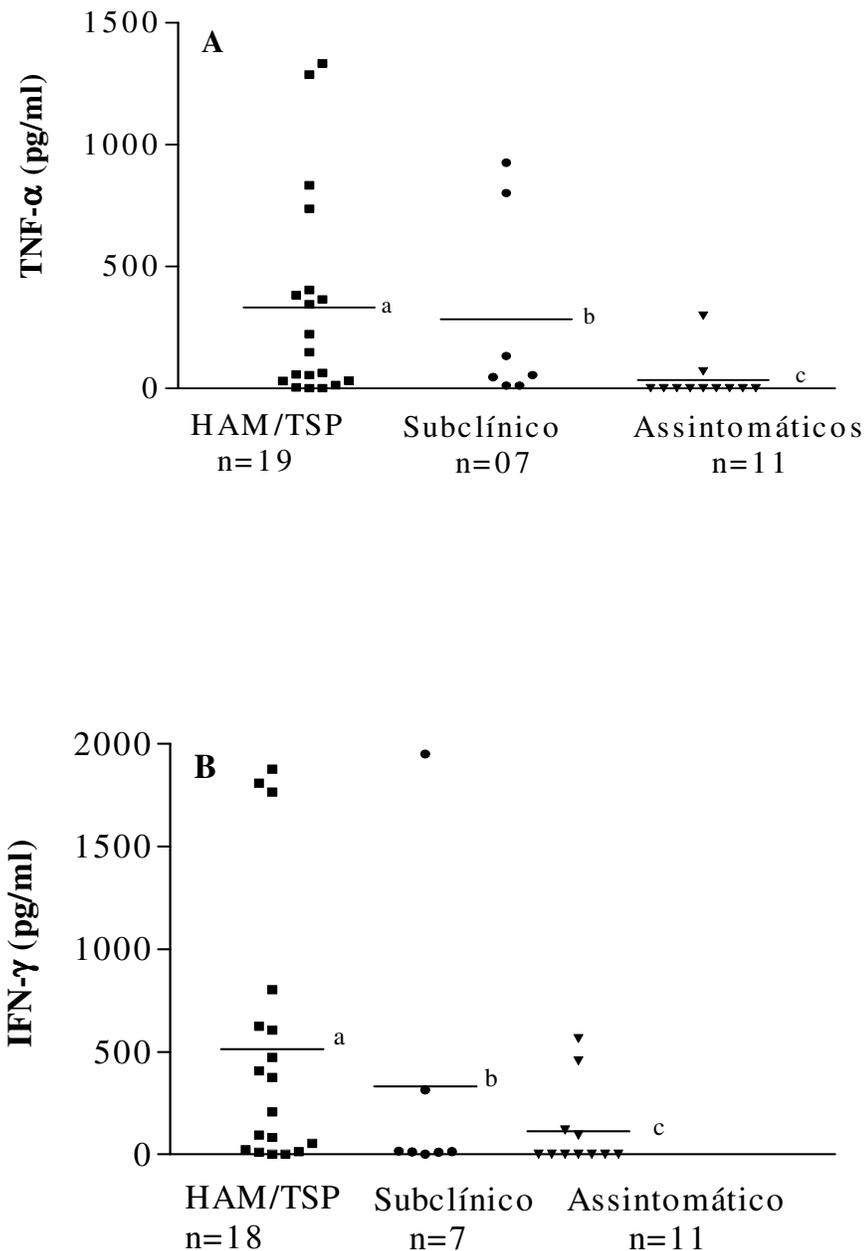


Gráfico 1. Produção espontânea de TNF- α (1A) e IFN- γ (1B) em culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), de indivíduos infectados pelo HTLV-I, classificados de acordo com o grau de disfunção neurológica. PBMC foram fracionadas e cultivadas in vitro em meio RPMI sem estímulo, por 72 horas à 37°C com 5% de CO₂. As concentrações de TNF- α e IFN- γ foram dosadas nos sobrenadantes, pela técnica de ELISA. As barras horizontais representam a mediana dos resultados obtidos. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo Teste de Mann-Whitney: Para TNF- α : a x c p = 0.0012; a x b p = 0.7505 e b x c p = 0.0059. Para IFN- γ : a x c p = 0.0170; a x b p = 0.193 e b x c p = 0.4669.

5.3 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DAS CITOCINAS TNF- α E IL-6

As concentrações séricas de TNF- α no grupo com HAM/TSP variaram de 0 a 121 pg/ml, com média \pm DP de 7 ± 28 pg/ml. Apenas 1 resultado apresentou concentrações detectáveis desta citocina (121pg/ml). No grupo de assintomáticos as concentrações séricas de TNF- α variaram de 0 a 74 pg/ml, com média \pm DP de 6 ± 18 pg/ml. Neste grupo também, apenas 1 indivíduo apresentou concentrações detectáveis desta citocina (74 pg/ml) (Tabela 2). Além disso, as concentrações séricas de TNF- α entre os grupos foram semelhantes ($p = 0.840$).

As concentrações séricas de IL-6 no grupo com HAM/TSP variaram de 0 a 60 pg/ml, com média \pm DP de 6 ± 14 pg/ml, tendo 6 resultados com concentrações acima do cut-off. No grupo dos assintomáticos, as concentrações séricas de IL-6 variaram de 0 a 87 pg/ml, com média \pm DP de 7 ± 20 pg/ml e 4 resultados acima do cut-off (Tabela 2). As concentrações séricas de IL-6 entre os grupos foram semelhantes ($p = 0.721$), (**Gráficos 2A e 2B**).

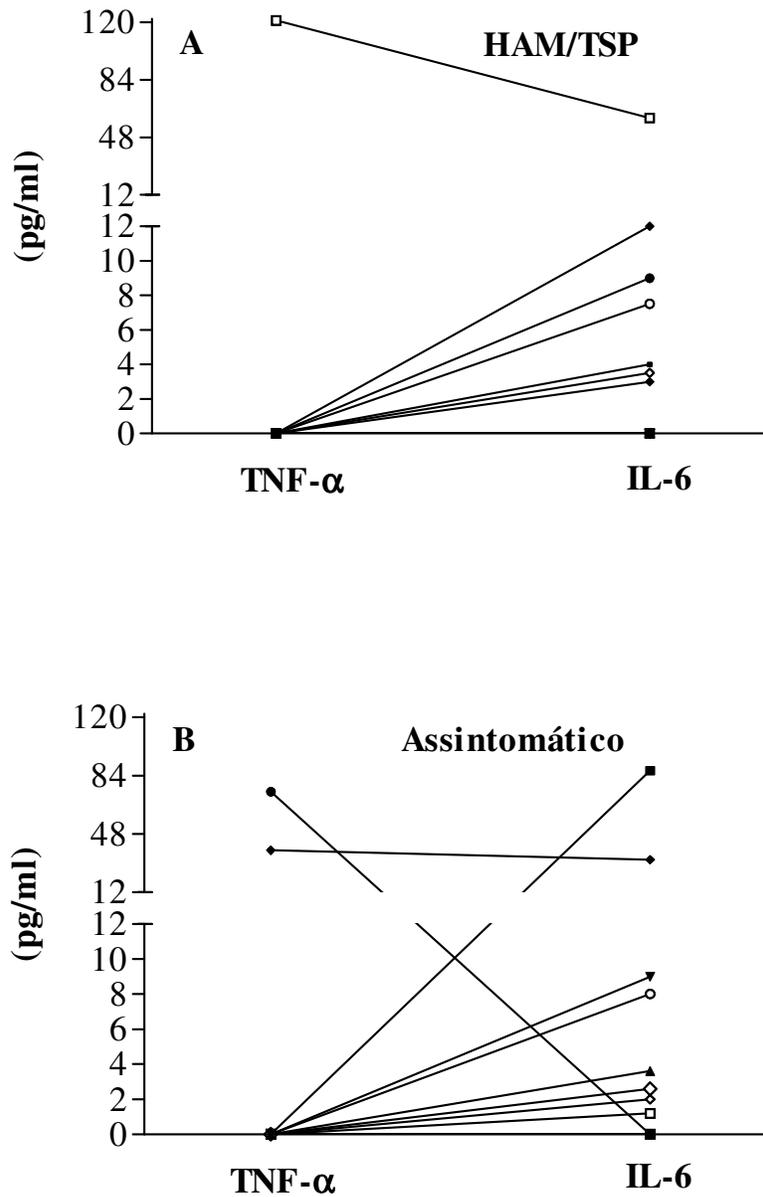


Gráfico 2. Concentrações séricas de TNF- α e IL-6 em plasmas de indivíduos infectados pelo HTLV-I com HAM/TSP (n=18) e assintomáticos (n=20); 2A e 2B, respectivamente. Cut-off: TNF- α = 0 pg/ml; IL-6 = 3.6 pg/ml.

5.4 EFEITO INIBIDOR DAS DROGAS PENTOXIFILINA, FORSKOLIN ROLIPRAM E TALIDOMIDA NA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS TNF- α E IFN- γ

PBMC não estimuladas dos indivíduos infectados com HTLV-I que apresentavam concentrações elevadas de TNF- α dos três grupos em estudo foram cultivadas em presença das drogas inibidoras de TNF- α : Pentoxifilina e Forskolin nas doses de 50 e 200 μ M, Rolipram nas doses de 0.01, 0.1 e 1.0 μ M e Talidomida nas doses de 1 e 50 μ M, escolhidas após avaliação da curva dose-resposta.

Os resultados de cada dose das drogas em estudo foram comparados aos da produção espontânea, calculando-se o percentual de inibição das citocinas TNF- α e IFN- γ nas doses utilizadas.

Também foi avaliada a viabilidade celular na menor e maior dose de cada droga em teste (**Tabela 3**).

Tabela 3. Avaliação da viabilidade celular após uso de Inibidores de TNF- α .

Drogas	Pentoxifilina		Forskolin		Rolipram		Talidomida	
Concentrações	HAM	Controle	HAM	Controle	HAM	Controle	HAM	Controle
1 μ M	76	94	95	98	91	94	98	96
10 μ M	82	94	87	95	76	100	82	96
50 μ M	85	94	83	100	62	95	81	96
100 μ M	90	93	75	100	82	100	87	97
200 μ M	80	98	79	93	83	85	71	92

Os dados representam o percentual (%) de células viáveis em relação à contagem inicial somente com o meio. Foram calculados percentuais médios da viabilidade celular com as drogas inibidoras em cinco concentrações diferentes. Para esta avaliação foram usados 3 pacientes com HAM/TSP e 3 controles negativos para HTLV-I. A viabilidade do meio foi 100%.

5.4.1 Pentoxifilina

A inibição da produção espontânea de TNF- α foi realizada utilizando células de 9 pacientes. Na concentração de 50 μ M, Pentoxifilina inibiu a produção de TNF- α em $71 \pm 26\%$ ($p= 0.0039$), e 200 μ M inibiu $77 \pm 25\%$ (**Gráfico 3A**).

A inibição da produção de IFN- γ foi realizada em células de 15 pacientes. Na concentração de 50 μ M de Pentoxifilina inibiu a produção de IFN- γ em $46 \pm 24\%$ ($p = 0.0001$), e 200 μ M inibiu $65 \pm 29\%$ (**Gráfico 3B**).

A viabilidade celular média nas doses de 50 μ M e 200 μ M foram de 85 e 80% respectivamente (Tabela 3).

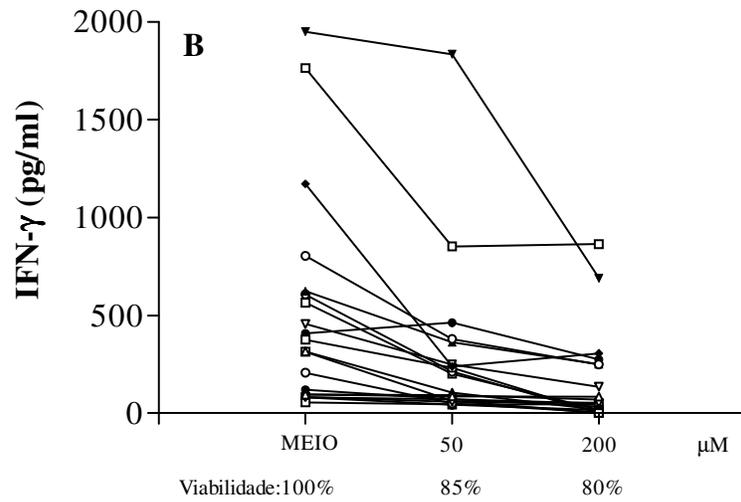
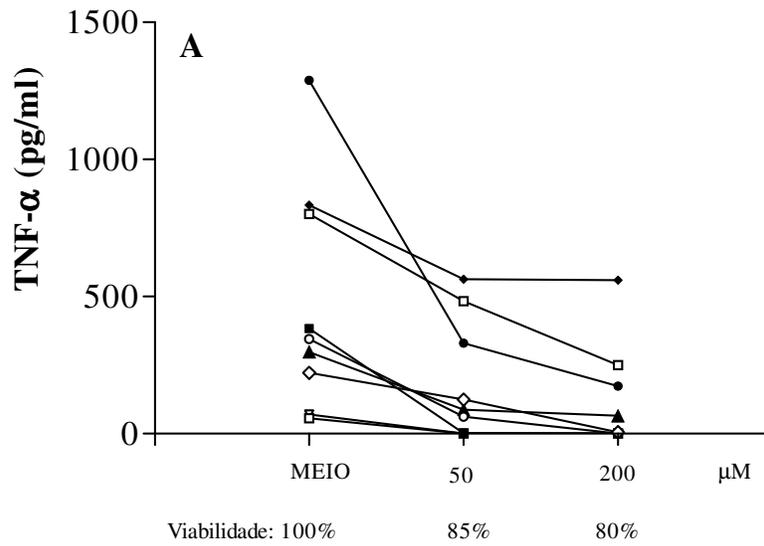


Gráfico 3. Concentrações de TNF- α (3A) e IFN- γ (3B) em sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) não estimuladas de indivíduos infectados pelo HTLV-I, com diferentes concentrações de Pentoxifilina. 3A (n=09) e 3B (n=15).

5.4.2 Forskolin

A inibição da produção de TNF- α foi realizada em PBMC de 9 pacientes. Na dose de 50 μ M Forskolin, inibiu a produção de TNF- α em $77 \pm 25\%$ ($p=0.0039$), e 200 μ M inibiu $73 \pm 29\%$ (**Gráfico 4A**)

Para IFN- γ foram utilizados PBMC de 13 pacientes. A inibição de Forskolin com 50 μ M foi de $61 \pm 22\%$, ($p=0.0001$) e 200 μ M inibiu $77 \pm 25\%$ (**Gráfico 4B**).

A viabilidade celular média nas doses de 50 μ M e 200 μ M foram de 83 e 79% respectivamente (Tabela 3).

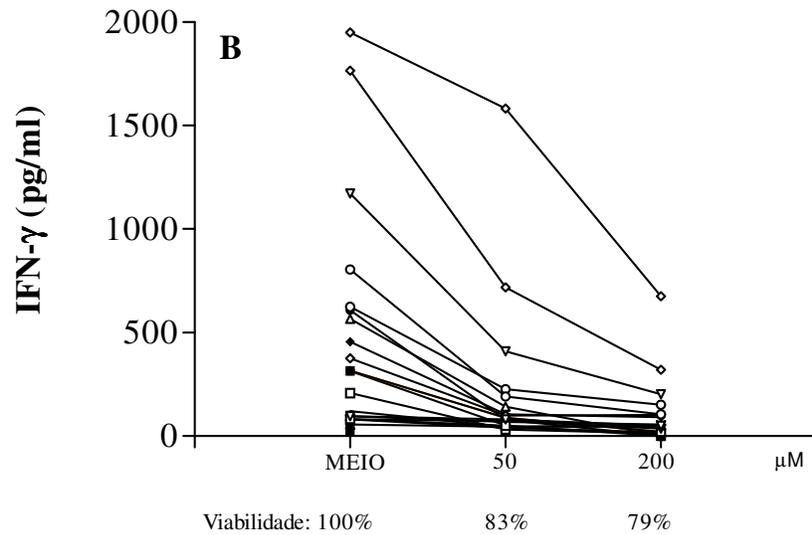
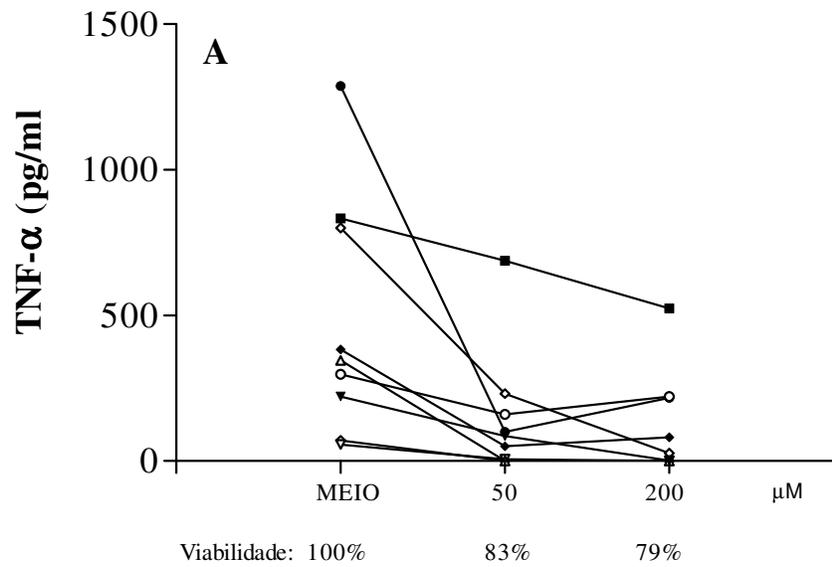


Gráfico 4. Concentrações de TNF- α (4A) e IFN- γ (4B) em sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) não estimuladas de indivíduos infectados pelo HTLV-I, com diferentes concentrações de Forskolin. 4 A (n=09) e 4B (n=13).

5.4.3 Rolipram

Rolipram inibiu a produção de TNF- α com a dose de 1 μ M (n = 8) em $80 \pm 22\%$ (p= 0.0078). Com doses inferiores, de 0.01 e 0.1 μ M (n = 5), os percentuais de inibição de TNF- α foram de $64 \pm 21\%$ e $62 \pm 21\%$, respectivamente, sugerindo que doses inferiores podem ser efetivas (p= 0.062) (**Gráfico 5A**).

Em relação ao IFN- γ , Rolipram inibiu a produção desta citocina na dose mínima de 0.01 μ M (n = 10) em $47 \pm 20\%$, (p = 0.0020) (**Gráfico 5B**).

Rolipram foi de todas as drogas testadas, a que melhor suprimiu a produção das citocinas TNF- α e IFN- γ e com maior viabilidade celular média de 91% na dose de 1 μ M (Tabela 3).

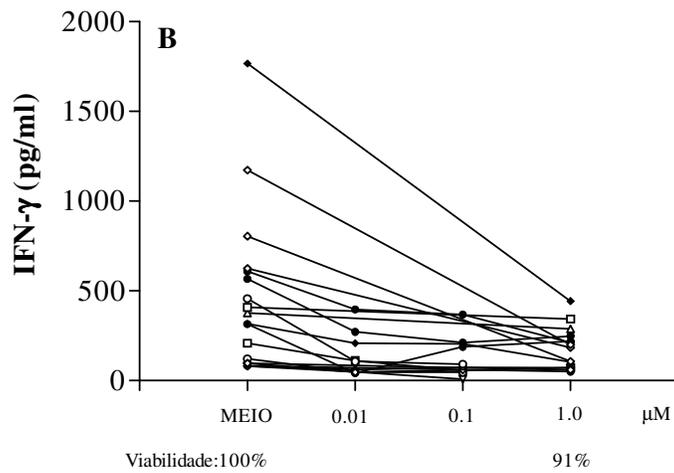
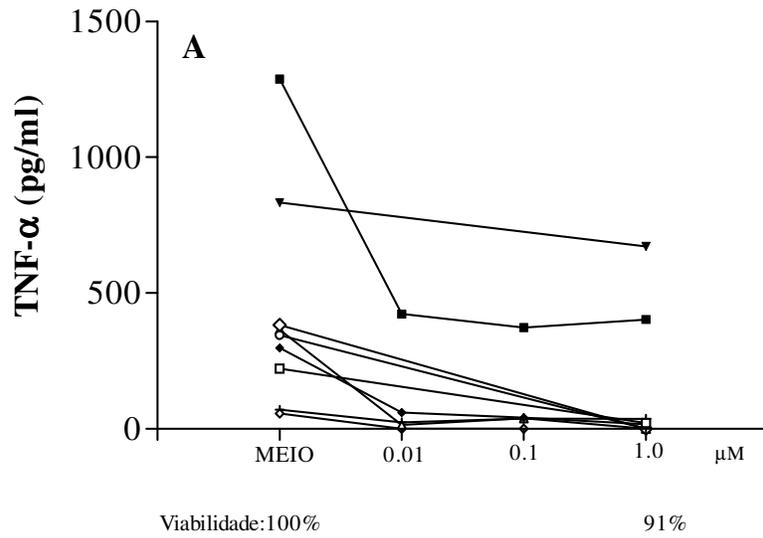


Gráfico 5. Concentrações de TNF- α (5A) e IFN- γ (5B) em sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) não estimulados de indivíduos infectados pelo HTLV-I, com diferentes concentrações de Rolipram. 5A (n=08) e 5B (n=10).

5.4.4 Talidomida

TAL inibiu a produção de TNF- α na dose 1 μ M (n = 8) em $65 \pm 22\%$ (p = 0.0078)

(**Gráfico 6A**).

Entretanto, a ação da Talidomida foi menor sobre a produção de IFN- γ em ambas as doses testadas, 1 e 50 μ M, com média de supressão de $30 \pm 10\%$ e $41 \pm 16\%$ respectivamente e em ambas o resultado estatístico foi o mesmo (p = 0.062) (**Gráfico 6B**).

A viabilidade celular média nas doses 1 μ M de 50 μ M foram de 98 e 81% respectivamente (Tabela 3).

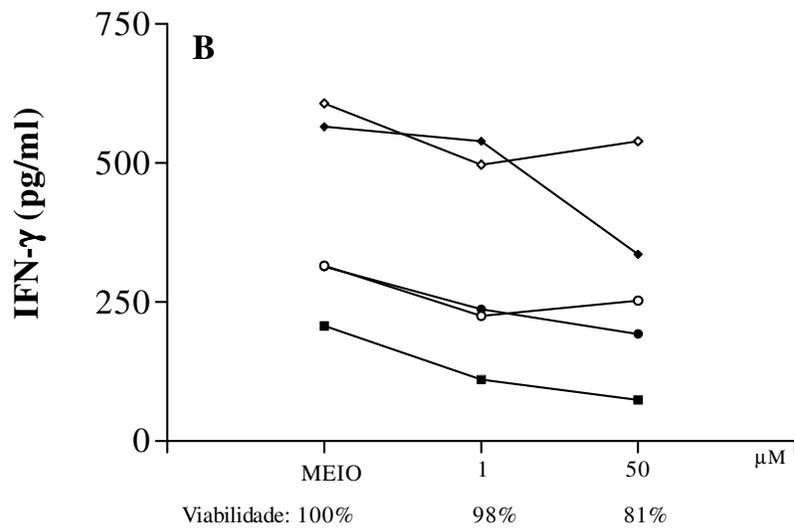
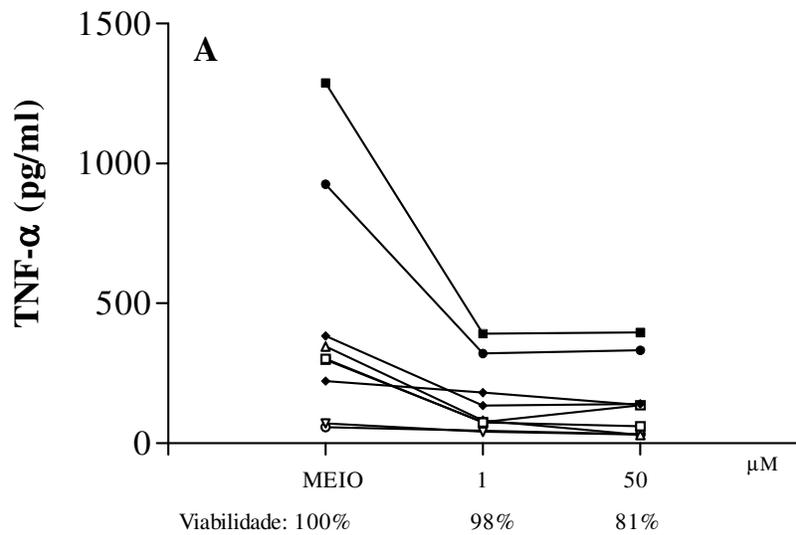


Gráfico 6. Concentrações de TNF- α (6A) e IFN- γ (6B) em sobrenadantes de células mononucleares do sangue (PBMC) não estimuladas de indivíduos infectados pelo HTLV-I, com diferentes concentrações de Talidomida. 6A (n=08) e 6B (n=05).

6 DISCUSSÃO

O HTLV-I é um vírus que efetivamente assume um grande impacto epidemiológico devido a sua distribuição mundial e alta prevalência em algumas regiões.

No Brasil o HTLV-I é considerado endêmico (Moreira ED, Jr. *et al.*, 1993) e Salvador (Bahia) registra uma das maiores taxas de soro prevalência do país com 1.35% em doadores de sangue (Galvão-Castro, 1997) e 1.76% na população geral (Dourado *et al.*, 2003).

A gravidade das manifestações clínicas, principalmente na HAM/TSP, resulta em incapacidade física progressiva, aumento do absenteísmo no trabalho e custos elevados com assistência médica. Na HAM/TSP, os processos que levam a inflamação e lesão tecidual na medula têm sido largamente estudados.

Vários trabalhos sugerem um papel importante do TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias na indução dessas lesões (Nakamura *et al.*, 1993; Jacobson SH *et al.*, 1996; Kubota *et al.*, 1998; Sandborn & Targan, 2002).

A falta de tratamento específico para esta infecção traz a necessidade de estudos que esclareçam melhor os mecanismos patogênicos das doenças associadas ao HTLV-I. O avanço no conhecimento da biologia molecular e o entendimento das bases imunológicas que envolvem as doenças inflamatórias crônicas, assim como o esclarecimento dos processos envolvidos na inflamação e lesão tecidual da medula em pacientes com HAM/TSP têm levado ao desenvolvimento de diversas terapias que objetivam caminhos para tratamentos específicos (Kurtovic & Segal, 2004).

A terapêutica anti-TNF- α tem sido bastante investigada em diversas doenças nas quais a concentração de TNF- α se encontra elevada sugerindo que a utilização de inibidores de TNF- α podem ser benéficos (Cabre *et al.*, 2000; Kurto-vic & Segal, 2004).

As drogas utilizadas para suprimir a produção de TNF- α podem agir inibindo a síntese ou processamento da molécula ou ainda inibindo a molécula já formada (Eigler *et al.*, 1997). O presente estudo analisa a produção espontânea das citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ , em PBMC de indivíduos infectados com HTLV-I entre os três grupos classificados e avalia o efeito in vitro de inibidores do TNF- α em inibir a produção dessas citocinas.

A utilização de escalas funcionais (EDSS e OSAME) para classificação dos pacientes demonstrou um grupo de HAM/TSP subclínico, o qual já apresenta algumas manifestações neurológicas pela escala EDSS e zero na escala de OSAME, não preenchendo os critérios clínicos de HAM/TSP estabelecidos pela OMS. A identificação desse grupo intermediário, denominado HAM/TSP subclínico é de extrema importância, estes pacientes podem ser precocemente beneficiados por uma futura terapêutica pelo fato de ainda não apresentarem lesões neurológicas de grande extensão. A produção espontânea das citocinas TNF- α e IFN- γ teve grande variação dentro dos grupos, sendo esta maior no grupo definido como HAM/TSP. O IFN- γ foi a citocina que apresentou maior variação, como demonstrado também em recentes publicações (Carvalho *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004). Nesse estudo foi demonstrada uma maior proliferação celular espontânea e produção das citocinas como TNF- α e IFN- γ em pacientes com HAM/TSP, comparados aos portadores assintomáticos. Além disso, observou-se a presença de maior percentual de células CD4 e CD8 expressando marcadores de ativação celular nos pacientes com HAM/TSP, comparados aos indivíduos assintomáticos (Carvalho *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2004).

Entretanto, é preciso ressaltar que a ativação celular isoladamente não esclarece os mecanismos de desenvolvimento da HAM/TSP. Considerando-se que a resposta imune é um somatório de interações entre moléculas de sinalização intracelular e receptores de superfície celular, os mecanismos de agressão tecidual ao nível do SNC precisam ser melhor esclarecidos.

A avaliação da concentração sérica de TNF- α nos pacientes estudados não revelou aumento significativo em relação às concentrações basais encontradas nos indivíduos normais. Estudos prévios de literatura relatam concentrações elevadas desta citocina no plasma, em uma variedade de infecções (sépsis, meningite bacteriana, esquistossomose aguda), doenças inflamatórias e autoimunes (AR, EM e CD) (Vassalli, 1992; Tracey & Cerami, 1994; Eigler *et al.*, 1997; Ribeiro-de-Jesus *et al.*, 1998). Apesar de nossos dados não terem mostrado concentrações elevadas dessa citocina no plasma, o número de pacientes ainda é pequeno para tirar alguma conclusão. Além disso, dosagens de TNF- α no líquido devem ser avaliadas, pois é o sítio de inflamação nessa doença.

Os resultados séricos da dosagem de IL-6, (HAM/TSP = 39% positivos e portadores assintomáticos = 25% positivos), estão de acordo com publicações prévias, que relatam o aumento desta citocina no plasma de indivíduos infectados pelo HTLV-I com HAM/TSP, bem como de portadores assintomáticos. Este aumento é maior em pacientes com HAM/TSP em relação aos assintomáticos, (Nishimoto *et al.*, 1990; Kishimoto *et al.*, 1992 a, b; Eigler *et al.*, 1997).

Em nosso trabalho as concentrações séricas de IL-6 foram maiores entre os pacientes com HAM/TSP que em assintomáticos, sugerindo que esta citocina possa ser utilizada como marcador de atividade de doença. A busca de marcadores séricos de inflamação, que sirvam como parâmetros neurológicos de evolução de doença e possam ser facilmente utilizados na prática clínica, é uma busca constante da pesquisa científica. As

alterações neurológicas observadas podem ser decorrentes de lesão estabelecida e nem sempre estão refletindo um processo inflamatório em atividade. Por esta razão, nem sempre se espera que o plasma reflita as alterações que ocorrem no SNC.

Nesse estudo, verificamos que a ação supressora dos inibidores de TNF- α foi dose dependente. É importante salientar que na Imunoterapia esses inibidores devem ser avaliados com cuidado, visando à utilização de uma dose ótima e sem efeitos adversos. É preciso considerar que o TNF- α é essencial para a ativação normal do sistema imune e tem efeito protetor contra agentes infecciosos intracelulares, ativando mecanismos microbicidas de macrófagos para destruição dos mesmos, devendo ser monitorado e preservado nos pacientes com infecções intracelulares e tumores. Como essa terapêutica pode também levar a proliferação do vírus HTLV-I, seria importante a associação deste tratamento a drogas antivirais. No entanto, não existe ainda uma boa resposta do HTLV-I às drogas antivirais em uso corrente.

Este é o primeiro trabalho comparando a ação de drogas inibidoras de TNF- α na produção espontânea desta citocina em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-I relacionando dose utilizada com índice de supressão e viabilidade celular. Além disso, o presente estudo avaliou o efeito de quatro drogas inibidoras de TNF- α , que agem na síntese da molécula de diferentes maneiras (Eigler *et al.*, 1997; Mora, 2003).

Entretanto, quando se analisa a ação desses inibidores na produção espontânea de TNF- α deve-se levar em conta que a ação das drogas *in vitro*, é diferente do que ocorre *in vivo*. A grande variabilidade no grau de ativação ou de comprometimento do sistema imune durante a infecção pelo HTLV-I causa também uma grande variabilidade de respostas às drogas, podendo ocasionar resultados diferentes do esperado.

A Pentoxifilina (PTX) é um inibidor inespecífico das fosfodiesterases que exerce a sua ação através da elevação do cAMP intracelular, reduzindo a hidrólise do cAMP após a

inibição das enzimas fosfodiesterases. PTX é a droga que tem sido mais extensivamente estudada em relação a sua atividade supressora sobre o TNF- α (Eigler *et al.*, 1997). Além disto, já é utilizada no homem para tratamento de diversas doenças. PTX já é utilizada com segurança na profilaxia clínica para tratamento de distúrbios do labirinto e como inibidora de TNF- α foi empregada na leishmaniose mucosa em associação com antimonial pentavalente, sendo eficaz em tratar casos refratários ao tratamento convencional, sugerindo sua eficácia em reduzir a resposta inflamatória (Lessa *et al.*, 2001).

No eritema nodoso da hanseníase, doença na qual também o TNF- α se encontra elevado, a PTX foi utilizada com resultados de cura nos pacientes que seguiram o tratamento completo (de Carsalade *et al.*, 2003). Na HAM/TSP, pacientes tratados com PTX oral (n=15) e avaliados após 4 semanas, apresentaram melhora da espasticidade e da dificuldade motora (n=13) e tiveram supressão de TNF- α (n=14). Além disso, não foram observados efeitos adversos, sugerindo que, a PTX pode ser benéfica no tratamento da HAM/TSP (Shirabe *et al.*, 1997) e afastado a possibilidade do tratamento aumentar a multiplicação do vírus e levar a uma piora de doença.

Os resultados do nosso trabalho demonstram que a PTX tem um bom potencial supressor na produção espontânea de TNF- α , além de manter a viabilidade celular. Em relação à supressão de IFN- γ , a ação da pentoxifilina foi um pouco menos expressiva, contudo teve efeito significativo. Assim esses dados reforçam a possibilidade da utilização desta droga para tratamento dos pacientes com HAM/TSP.

O Forskolin (FK) também é um inibidor inespecífico das fosfodiesterases cuja ação é a mesma da PTX. Os resultados da ação supressora de FK na produção espontânea das citocinas TNF- α e IFN- γ foram similares aos obtidos com PTX. Entretanto houve uma

pequena inversão em relação ao IFN- γ , tendo sido a ação supressora de FK foi um pouco mais expressiva na produção espontânea de IFN- γ que na produção do TNF- α .

O Rolipram (ROL) é um inibidor específico das fosfodiesterases, age sinergicamente com prostanóides na elevação do cAMP, sua ação é considerada 500 vezes mais potente que a da PTX, na supressão de TNF- α (Eigler *et al.*, 1997).

O ROL é considerado o mais potente supressor de TNF- α e seu efeito já foi testado em PBMC de pacientes com HAM/TSP e células de linhagem com diferentes doses. Em ambos os tipos de células, ROL suprimiu a produção de TNF- α de maneira dose dependente (Hatae *et al.*, 1997). Nossos resultados mostraram que a produção espontânea de TNF- α foi suprimida com apenas 1 μ M de ROL, preservando a viabilidade celular. Adicionalmente ROL inibiu o IFN- γ com uma concentração ainda mais baixa (0.01 μ M), demonstrando ser um excelente inibidor destas citocinas. Esses resultados sugerem que ROL possa ser benéfico na terapêutica da HAM/TSP, pois ambas as citocinas estão elevadas nesses pacientes.

A Talidomida (TAL) tem mostrado um potencial clínico em inúmeras condições nas quais as opções terapêuticas são limitadas. A sua eficácia clínica está associada às diversas propriedades que possui, incluindo a inibição do TNF- α .

A síntese de análogos de TAL é um progressivo empenho da pesquisa científica objetivando a obtenção de medicamentos com atividade elevada e redução de efeitos colaterais. A série de 2ª geração de análogos de TAL tem alto potencial terapêutico e são inibidores específicos das fosfodiesterase. A limitação de uso dessa droga em doenças inflamatórias deve-se ao seu efeito teratogênico. TAL exerce sua ação através do aumento da degradação do mRNA do TNF- α em macrófagos (Sandborn & Targan, 2002).

Os nossos resultados demonstraram que a TAL inibiu a produção espontânea de TNF- α com uma dose muito baixa, mostrando ser um bom supressor desta citocina em PBMC além de preservar a viabilidade celular.

Apesar destes resultados, a TAL não teve efeito supressor sobre a produção espontânea de IFN- γ .

A talidomida tem sido relatada na literatura como uma droga que apesar de ter um bom potencial terapêutico em diversas condições clínicas não é um bom inibidor de TNF- α *in vitro* (Marriott *et al.*, 1999). Nossos dados mostraram que TAL tem um bom potencial supressor *in vitro*, em relação à produção espontânea de TNF- α . A especificidade da TAL em inibir apenas TNF- α , preservando a produção do IFN- γ , pode ser importante em situações onde seja necessário manter a função do IFN- γ , como nas infecções por agentes intracelulares (Moreira AL *et al.*, 1993).

Burroughs e colaboradores, em um trabalho experimental com meningite bacteriana, utilizaram a talidomida, verificando que esta inibiu TNF- α sem contudo, afetar significativamente as concentrações de IL-1 (Burroughs *et al.*, 1995).

A TAL tem sido apontada como uma droga com potencial inibidor de TNF- α em doenças cujo quadro clínico é atribuído à produção elevada de TNF- α como na Hanseníase (Sampaio *et al.*, 2002).

As drogas testadas em neste estudo mostraram efeito inibitório *in vitro* sobre a produção de TNF- α e algumas delas foram capazes de inibir também a produção de IFN- γ . Como na HAM/TSP foi demonstrado um papel do TNF- α nas lesões neurológicas, existe um racional para o uso desses imunomoduladores na tentativa de impedir a progressão da doença. No entanto, os ensaios clínicos terapêuticos no homem devem ser conduzidos com cuidado, considerando que essas citocinas podem ter um papel importante no controle da replicação viral. A descoberta de drogas antivirais com efeito sobre o

HTLV-I iria facilitar bastante o tratamento com imunomoduladores, pois reduziria a possibilidade de induzir um aumento da viremia. Como os efeitos observados na infecção pelo HTLV-I são mais decorrentes de uma hiperativação da resposta imune do que efeito citopático do vírus há uma boa perspectiva de que essa terapia imunomoduladora melhore as manifestações clínicas da doença. Diversos aspectos reforçam a possibilidade de uso terapêutico das drogas inibidoras de TNF- α : 1) A maioria dos infectados não desenvolve doença. 2) Os pacientes com HAM/TSP apresentam concentrações mais elevadas de TNF- α e IFN- γ do que os portadores assintomáticos. 3) Os pacientes com HAM/TSP respondem clinicamente as drogas imunossupressoras como corticosteróides, principalmente nas fases iniciais de evolução da doença, sem aumento da disseminação do vírus. 4) A PTX já foi utilizada no tratamento da HAM/TSP com melhora clínica e sem evidências de aumento da viremia. Desta maneira estudos futuros devem ser melhor conduzidos com o objetivo de investigar os efeitos dessas drogas no tratamento da HAM/TSP e de outras doenças relacionadas ao HTLV-I.

7 CONCLUSÕES

1- As concentrações de TNF- α e IFN- γ em sobrenadantes de PBMC não estimulados foram maiores no grupo de pacientes com HAM/TSP quando comparadas às dos assintomáticos e subclínicos;

2 - As concentrações séricas de TNF- α e IL-6 não foram significativamente diferentes nos grupos com HAM/TSP e assintomáticos. Esses resultados não foram conclusivos, provavelmente pelo número pequeno de indivíduos avaliados.

3 - As drogas testadas foram capazes de suprimir a produção espontânea de TNF- α e IFN- γ em PBMC de pacientes com HAM/TSP. A supressão foi dose-dependente.

8 PERSPECTIVAS

REALIZAÇÃO DE ENSAIOS CLÍNICOS COM DROGAS INIBIDORAS DE TNF- α

A - Drogas como o Rolipram necessitam ser avaliadas em ensaios clínicos de Fase I: avaliação da farmacocinética e farmacodinâmica (tolerabilidade, toxicidade e percentual de inibição do TNF- α *in vivo*)

B - Drogas como a Talidomida que já foi utilizada em outras doenças pode ser testada em ensaios clínicos de Fase II: pacientes em estágios mais graves da HAM/TSP.

C - A Pentoxifilina que já foi utilizada na HAM/TSP em estudo aberto, pode ser avaliada em ensaio clínico de Fase III: randomizado, duplo-cego, placebo controlado, com número expressivo de casos e um período prolongado de seguimento evolutivo pós-tratamento. Para que possam ser melhor avaliados os efeitos terapêuticos dessa droga em pacientes em fases iniciais da doença.

D - A Pentoxifilina pode também ser utilizada no grupo de pacientes com HAM/TSP subclínica, os quais podem ser acompanhados em estudo prospectivo, sendo bons alvos para a terapêutica, caso apresentem sinais de evolução da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALCANTARA JUNIOR; VAN DOOREN, S.; GONCALVES, M.S.; KASHIMA, S.; COSTA, M.C.; SANTOS, F.L.; BITTENCOURT, A.L.; DOURADO FILHO, I. A.A.; COVAS, D.T.; VANDAMME, A.M.; GALVAO-CASTRO, B. Globin haplotypes of human T-cell lymphotropic virus type I-infected individuals in Salvador, Bahia, Brazil, suggest a post-Columbian African origin of this virus. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 33(4):536-542, 2003.

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

ARAÚJO, A. Progression of neurological disability in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Neurol. Sci.*, 129:147-151, 1995.

_____. Tratamento da Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-I. São Paulo: Academia Brasileira de Neurologia, 1998. p. 157-162.

ARAÚJO, A. de. Neuropatias associadas ao protovírus T- linfotrófico humano (HTLV-I)-Aspectos históricos. *Rev. Bras. Neurol.*, 40-46, 1992.

ARAÚJO, A.D. HTLV-I Infection and neurological disease in Rio de Janeiro. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.*, 55:153-155, 1992a.

_____ A biologia do protovírus T- linfotrópico humano (HTLV-I). Rev. Bras. Neurol., 3-9, 1992b.

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 anti-body directed to the IL-2/15R beta receptor. J. Immunol., 163(7):4064-4072, 1999.

AZIMI, N.; NAGAI, M.; JACOBSON, S.; WALDMANN, T.A. IL-15 plays a major role in the persistence of Tax-specific CD8 cells in HAM/TSP patients. Proc. Natl. Acad. Sci. U SA., 98(25):14559-14564, 2001.

BABA, E.; NAKAMURA, M.; TANAKA, Y.; KUROKI, M.; ITOYAMA, Y.; NAKANO, S.; NIHO, Y. Multiple neutralizing B-cell epitopes of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) identified by human monoclonal antibodies. A basis for the design of an HTLV-1 peptide vaccine. J. Immunol., 151(2):1013-1024, 1993.

BANGHAM, C.R. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. J. Gen. Virol., 84(Pt 12):3177-3189, 2003.

BARMAK, K.; HARHAJ, E.W.; WIGDAHL, B. Mediators of central nervous system damage during the progression of human T-cell leukemia type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. J. Neurovirol., 9(5):522-529, 2003.

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:Suppl 1 S76-84, 1996.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N. Engl. J. Med.*, 316(7):379-385, 1987.

BIELEKOVA, B.; LINCOLN, A.; MCFARLAND, H.; MARTIN, R. Therapeutic potential of phosphodiesterase-4 and -3 inhibitors in Th1-mediated autoimmune diseases. *J. Immunol.*, 164(2):1117-1124, 2000.

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

BRITO, A. Infecção pelo HTLV-I/II no Estado da Bahia. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 1998.

BURROUGHS, M.H.; TSENOVA-BERKOVA, L.; SOKOL, K.; OSSIG, J.; TUOMANEN, E.; KAPLAN, G. Effect of thalidomide on the inflammatory response in cerebrospinal fluid in experimental bacterial meningitis. *Microb. Pathog.* 19(4):245-255, 1995.

CABRE, P.; AL-FAHIM, A.; OGER, J. Enhanced adherence of endothelial cells to blood mononuclear cells in HAM/TSP. *Rev. Neurol., (Paris)*, 155(4): 273-279, 1999.

CABRE, P.; SMADJA, D.; CABIE, A.; NEWTON, C.R. HTLV-1 and HIV infections of the central nervous system in tropical areas. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 68(5): 550-557, 2000.

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; RIBAS, J.G.; CATALAN-SOARES, B.C.; MARTINS, M.L.; BRITO-MELO, G.E.; MARTINS-FILHO, O.A.; PINHEIRO, S.R.; ARAUJO, A.D.E. Q.; GALVAO-CASTRO, B.; DE OLIVEIRA, M.S.; GUEDES, A.C.;

PROIETTI, F.A. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med.Trop.*, 35(5):499-508, 2002.

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

CASTRO, N.; OLIVEIRA, P.; FREITAS, D.; RODRIGUES, W.; MUNIZ, A.; CARVALHO, E. Erectile dysfunction and HTLV-I infection: a silent problem. *Int. J. Impot. Res.*, 17(4):364-369, 2005.

COFFIN, J.M. Retrovirus restriction revealed. *Nature*, 382(6594):762-763, 1996.

DAENKE, S.; NIGHTINGALE, S.; CRUICKSHANK, J.K.; BANGHAM, C.R. Sequence variants of human T-cell lymphotropic virus type I from patients with tropical spastic paraparesis and adult T-cell leukemia do not distinguish neurological from leukemic isolates. *J. Virol.*, 64(3):1278-1282, 1990.

DE CARSALADE, G.Y.; ACHIRAFI, A.; FLAGEUL, B. Pentoxifylline in the treatment of erythema nodosum leprosum: results of an open study. *Acta Leprol.*, 12(3): 117-122, 2003.

DELAMARRE, L.; ROSENBERG, A.R.; PIQUE, C.; PHAM, D.; CALLEBAUT, I.; DOKHELAR, M.C. The HTLV-I envelope glycoproteins: structure and functions. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 13:Suppl 1, S85-91, 1996.

DIEZ-RUIZ, A.; TILZ, G.P.; ZANGERLE, R.; BAIER-BITTERLICH, G.; WACHTER, H.; FUCHS, D. soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis. *Eur. J. Haematol.*, 54(1): 1-8, 1995.

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.

DUTRA, W.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; CANCADO, J.R.; PINTO-DIAS, J.C.; BRENER, Z.; GAZZINELLI, G.; CARVALHO, J.F.; COLLEY, D.G. Chagasic patients lack CD28 expression on many of their circulating T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* , 43(1):88-93, 1996.

EDLICH, R.F.; ARNETTE, J.A.; WILLIAMS, F.M. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I). *J. Emerg. Med.*, 18(1):109-119, 2000.

EIGLER, A.; SINHA, B.; HARTMANN, G.; ENDRES, S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol. Today*, 18(10):487-492, 1997.

EIGLER, A.; SIEGMUND, B.; EMMERICH, U.; BAUMANN, K.H.; HARTMANN, G.; ENDRES, S. Anti-inflammatory activities of Camp elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. *J. Leukoc. Biol.*, 63(1): 101-107, 1998.

FERREIRA JUNIOR, O.C.; PLANELLES, V.; ROSENBLATT, J.D. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis.

Blood Rev., 11(2):91-104, 1997.

FEUER, G.; STEWART, S.A.; BAIRD, S.M.; LEE, F.; FEUER, R.; CHEN, I.S.
Potential role of natural killer cells in controlling tumorigenesis by human T-cell
leukemia vi-ruses. *J. Virol.*, 69(2):1328-1333, 1995.

FRANCHINI, G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus
type I infection. *Blood*, 86(10):3619-3639, 1995.

FRANCHINI, G.; STREICHER, H. Human T-cell leukaemia virus. *Baillieres. Clin .
Haematol.*, 8(1):131-148, 1995.

FUJIMOTO, T.; NAKAMURA, T.; FURUYA, T.; NAKANE, S.; SHIRABE, S.;
KAMBARA, C.; HAMASAKI, S.; YOSHIMURA, T.; EGUCHI, K. Relationship
between the clinical efficacy of pentoxifylline treatment and elevation of serum T helper
type 2 cytokine levels in patients with human T-lymphotropic virus type I-associated
myelopathy. *Intern. Med.*, 38(9):717-721, 1999.

FUNK, J.O.; ERNST, M.; SCHONHARTING, M.M.; ZABEL, P. Pentoxifylline exerts
synergistic immunomodulatory effects in combination with dexamethasone or
cyclosporin A. *Int. J. Immunopharmacol.*, 17(12):1007-1016, 1995.

GALVÃO-CASTRO, B. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among
blood donors:a nationwide Brazilian study. *Transfusion*, 37:242-243, 1997.

GANTNER, F.; KUPFERSCHMIDT, R.; SCHUDT, C.; WENDEL, A.;
HATZELMANN, A. In vitro differentiation of human monocytes to macrophages:
change of PDE profile and its relationship to suppression of tumour necrosis factor-
alpha release by PDE inhibitors. *Br. J. Pharmacol.*, 121(2):221-231, 1997.

GESSAIN, A.; BARIN, F.; VERNANT, J.C.; GOUT, O.; MAURS, L.; CALENDER, A. de The G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*, 2(8452):407-410, 1985.

GOON, P.K.; IGAKURA, T.; HANON, E.; MOSLEY, A.J.; BARFIELD, A.; BARNARD, A.L.; KAFTANTZI, L.; TANAKA, Y.; TAYLOR, G.P.; WEBER, J.N.; BANGHAM, C.R. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD4+ T cells: immunodominance hierarchy and preferential infection with HTLV-I. *J. Immunol.*, 172(3):1735-1743, 2004a.

GOON, P.K.; BIANCARDI, A.; FAST, N.; IGAKURA, T.; HANON, E.; MOSLEY, A.J.; ASQUITH, B.; GOULD, K.G.; MARSHALL, S.; TAYLOR, G.P.; BANGHAM, C.R. Human T cell lymphotropic virus (HTLV) type-1-specific CD8+ T cells: frequency and immunodominance hierarchy. *J. Infect. Dis.*, 189(12): 2294-2298, 2004b.

GOUT, O.; GESSAIN, A.; IBA-ZIZEN, M.; KOUZAN, S.; BOLGERT, F.; DE THE, G.; LYON-CAEN, O. The effect of zidovudine on chronic myelopathy associated with HTLV-1. *J. Neurol.*, 238(2):108-109, 1991.

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

GRASSMANN, R.; BERCHTOLD, S.; RADANT, I.; ALT, M.; FLECKENSTEIN, B.; SODROSKI, J.G.; HASELTINE, W.A.; RAMSTEDT, U. Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. *J. Virol.*, 66(7):4570-4575, 1992.

HAN, J.; THOMPSON, P.; BEUTLER, B. Dexamethasone and pentoxifylline inhibit endotoxin induced cachectin/tumor necrosis factor synthesis at separate points in the signaling pathway. *J. Exp. Med.*, 172(1):391-394, 1990.

HARTMANN, G.; BIDLINGMAIER, C.; SIEGMUND, B.; ALBRICH, S.; SCHULZE, J.; TSCHOEP, K.; EIGLER, A.; LEHR, H.A.; ENDRES, S. Specific type IV phosphodiesterase inhibitor rolipram mitigates experimental colitis in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 292(1):22-30, 2000.

HATAE, T.; HARA, H.; KOBAYASHI, T.; WATANABE, T. The effect of rolipram on the production of cytokines in HTLV-I infected cell lines and peripheral blood mononuclear cells of patients with HTLV-I-associated myelopathy (HAM). *J. Neurol. Sci.*, 148(1): 87-94, 1997.

HINO, S.; YAMAGUCHI, K.; KATAMINE, S.; SUGIYAMA, H.; AMAGASAKI, T.; KINOSHITA, K.; YOSHIDA, Y.; DOI, H.; TSUJI, Y.; MIYAMOTO, T. Mother to child transmission of human T-cell leukemia virus type-I. *Jpn. J. Cancer Res.*, 76(6):474-480, 1985.

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

_____. Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63(2):308-333, 1999.

HOLLSBERG, P.; AUSUBEL, L.; HAFLER, D.A. Human T cell lymphotropic virus type I-induced T cell activation. Resistance to TGF-beta 1-induced suppression. *J. Immunol.*, 153(2):566-573, 1994.

HOLLSBERG, P.; MELINEK, J.; BENJAMIN, D.; HAFLER, D.A. Increased protein kinase C activity in human memory T cells. *Cell Immunol.*, 149(1):170-179, 1993.

HOLLSBERG, P.; WUCHERPFENNIG, K.W.; AUSUBEL, .LJ.: CALVO, V.; BIERER, B.E.; HAFLER, D.A. Characterization of HTLV-I in vivo infected T cell clones. IL-2-independent growth of nontransformed T cells. *J. Immunol.*, 148(10):3256-3263, 1992.

IJICHI, S.; EIRAKU, N.; OSAME, M.; IZUMO, S.; KUBOTA, R.; MARUYAMA, I.; MATSUMOTO, M.; SONOD,A S. In vitro modulation of lymphocyte proliferation by prednisolone and interferon-alpha in patients with HTLV-I-associated myelopathy (HAM). *J. Neuroimmunol.*, 23(2):175-178, 1989.

IWASAKI, Y. Human T cell leukemia virus type I infection and chronic myelo-pathy. *Brain Pathol.*, 3(1): 1-10, 1993.

JACOBSON S. Cellular immune responses to HTLV-I: immunopathogenic role in HTLVI-I- associated neurologic disease. *J. Acquir. Immune Defic .Syndr. Hum. Retrovirol.*, 13:Suppl 1 S100-6, 1996.

JACOBSON, S.; REUBEN, J.S.; STREILEIN, R.D.; PALKER, T.J. Induction of CD4+, human T lymphotropic virus type-1-specific cytotoxic T lymphocytes from patients with HAM/TSP. Recognition of an immunogenic region of the gp46 envelope glycoprotein of human T lymphotropic virus type-1. *J. Immunol.*, 146(4):1155-1162, 1991.

JACOBSON, S.H.; LU, Y.; BRAUNER, A. Tumour necrosis factor soluble receptors I and II and interleukin-1 receptor antagonist in acute pyelonephritis in relation to bacterial virulence associated traits and renal function. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 11(11):, 2209-2214, 1996.

JEFFERY, K.J.; USUKU, K.; HALL, S.E.; MATSUMOTO, W.; TAYLOR, G.P.; PROCTER, J.; BUNCE, M.; OGG, G.S.; WELSH, K.I.; WEBER, J.N.; LLOYD, A.L.; NOWAK, M.A.; NAGAI, M.; KODAMA, D.; IZUMO, S.; OSAME, M.; BANGHAM, C.R. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(7):3848-3853, 1999.

JOHNSON, J.M.; HARROD, R.; FRANCHINI, G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *Int. J. Exp. Pathol.*, 82(3):135-147, 2001.

KAJIYAMA, W.; KASHIWAGI, S.; NOMURA, H.; IKEMATSU, H.; HAYASHI, J.; IKEMATSU, W. Seroepidemiologic study of antibody to adult T-cell leukemia virus in Okinawa, Japan. *Am. J. Epidemiol.*, 123(1):41-47, 1986.

KATAOKA, A.; IMAI, H.; INAYOSHI, S.; TSUDA T. Intermittent high-dose vitamin C therapy in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Rinsho Shinkeigaku*, 33(3): 282-288, 1993.

KELLY, K.; DAVIS, P.; MITSUYA, H.; IRVING, S.; WRIGHT, J.; GRASSMANN, R.; FLECKENSTEIN, B.; WANO, Y.; GREENE, W.; SIEBENLIST, U. A high

proportion of early response genes are constitutively activated in T cells by HTLV-I. *Oncogene*, 7(8): 1463-1470, 1992.

KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; TAGA, T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science*, 258(5082):593-597, 1992a.

_____. IL-6 receptor and mechanism of signal transduction. *Int. J. Immunopharmacol.*, 14(3): 431-438, 1992b.

KITAJIMA, I.; OSAME, M.; IZUMO, S.; IGATA, A. Immunological studies of HTLV-I associated myelopathy. *Autoimmunity*, 1(2):125-131, 1988.

KONSTANTINOS, A.P. Tumor Necrose Factor: Biology and Therapeutic Inhibitors. *Gastroenterology*, 119(4):1148-1157, 2000.

KRAUSE, I.; VALESINI, G.; SCRIVO, R.; SHOENFELD, Y. Autoimmune aspects of cytokine and anticytokine therapies. *Am. J. Med.*, 115(5):390-397, 2003.

KUBOTA, R.; KAWANISHI, T.; MATSUBARA, H.; MANNING, A.; JACOBSON, S. Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-specific CD8+ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic

paraparesis patients by intracellular cytokine detection. *J. Immunol.*, 161(1):482-488, 1998.

KUBOTA, R.; NAGAI, M.; KAWANISHI, T.; OSAME, M.; JACOBSON, S. Increased HTLV type 1 tax specific CD8+ cells in HTLV type 1-associated myelopathy/tropical

spastic paraparesis: correlation with HTLV type 1 proviral load. *AIDS Res. Hum Retroviruses.*, 16(16):1705-1709, 2000.

KUBOTA, R.; UMEHARA, F.; IZUMO, S.; IJICHI, S.; MATSUMURO, K.; YASHIKI, S.; FUJIYOSHI, T.; SONODA, S.; OSAME, M. HTLV-I proviral DNA amount correlates with infiltrating CD4+ lymphocytes in the spinal cord from patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neuroimmunol.*, 53(1):23-29, 1994.

KUNKEL, S.L.; SPENGLER, M.; KWON, G.; MAY, M.A.; REMICK, D.G. Production and regulation of tumor necrosis factor alpha. A cellular and molecular analysis. *Methods Achiev Exp Pathol.*, 13:240-259, 1988.

KURODA, Y.; TAKASHIMA, H.; IKEDA, A.; ENDO, C.; NESHIGE, R.; KAKIGI, R.; SHIBASAKI, H. Treatment of HTLV-I-associated myelopathy with high-dose intravenous gammaglobulin. *J. Neurol.*, 238(6):309-314, 1991.

KURODA, Y.; KUROHARA, K.; FUJIYAMA, F.; TAKASHIMA, H.; ENDO, C.; MATSUI, M.; NESHIGE, R.; KAKIGI, R. Systemic interferon-alpha in the treatment of HTLV-I-associated myelopathy. *Acta Neurol. Scand.*, 86(1):82-86, 1992.

KURTOVIC, J.; SEGAL, I. Recent advances in biological therapy for inflammatory bowel disease. *Trop. Gastroenterol.*, 25(1): 9-14, 2004.

KURTZKE, J.F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33(11):1444-1452, 1983.

LAGRENADE, L.; HANCHARD, B.; FLETCHER, V.; CRANSTON, B.; BLATTNER, W. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet*, 336(8727):1345-1347, 1990.

_____ ; MANNNS, A.; FLETCHER, V.; DERM, D.; CARBERRY, C.; HANCHARD, B.; MA-LONEY, E.M.; CRANSTON, B.; WILLIAMS, N.P.; WILKS, R.; KANG, E.C.; BLATTNER, W.A. Clinical, pathologic, and immunologic features of human T-lymphotrophic virus type I-associated infective dermatitis in children. *Arch. Dermatol.* , 134(4):439-444, 1998.

LAIRMORE, M.D.; RUDOLPH, D.L.; ROBERTS, B.D.; DEZZUTTI, C.S.; LAL, R.B. Characterization of a B-cell immunodominant epitope of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) envelope gp46. *Cancer Lett.*, 66(1):11-20, 1992.

LAL, R.B.; RUDOLPH, D.L.; DEZZUTTI, C.S.; LINSLEY, P.S.; PRINCE, H.E. Costimulatory effects of T cell proliferation during infection with human T lymphotropic virus types I and II are mediated through CD80 and CD86 ligands. *J. Immunol.*, 157(3): 1288-1296, 1996.

LESSA, H.A.; MACHADO, P.; LIMA, F.; CRUZ, A.A.; BACELLAR, O; GUERREIRO, J.; CARVALHO, E.M. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65(2);87-89, 2001.

LEVIN, M.C.; JACOBSON, S. Cellular and humoral immune responses associated with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 835:142-152, 1997.

LI, X.H.; GAYNOR, R,B. Regulation of NF-kappaB by the HTLV-1 Tax protein. *Gene Expr.*, 7(4-6):233-245, 1999.

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(Pt 10):2469-2474, 1998.

MANEL, N.; KIM, F.J.; KINET, S.; TAYLOR, N.; SITBON, M.; BATTINI, J.L. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell*, 115(4):449-459, 2003.

MARRIOTT, J.B.; MULLER, G.; DALGLEISH, A.G. Thalidomide as an emerging immuno-therapeutic agent. *Immunol. Today*, 20(12):538-540, 1999.

MATSUO, H.; NAKAMURA, T.; TSUJIHATA, M.; KINOSHITA, I.; SATOH, A.; TOMITA, I.; SHIRABE, S.; SHIBAYAMA, K.; NAGATAKI, S. Plasmapheresis in treatment of human T-lymphotropic virus type-I associated myelopathy. *Lancet*, 2(8620): 1109-1113, 1988.

MATSUOKA, M. PTCL: lessons from adult T-cell leukemia. *Int. J. Hematol.*, 76 (Suppl 2):116-117, 2002.

MATSUZAKI, T.; NAKAGAWA, M.; NAGAI, M.; USUKU, K.; HIGUCHI, I.; ARIMURA, K.; KUBOTA, H.; IZUMO, S.; AKIBA, S.; OSAME, M. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. *J. Neurovirol.*, 7(3): 228-234, 2001.

MEDINA, R.A.; OWEN, G.I. Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol. Res.*, 35(1): 9-26, 2002.

MONTGOMERY, R.D.; CRUICKSHANK, E.K.; ROBERTSON, W.B.;
MCMENEMEY, W.H. Clinical and Pathological Observations on Jamaican
Neuropathy; a Report on 206 Cases. *Brain*, 87:425-462, 1964.

MORA, C.A. Human T-lymphotropic virus Type I-associated Myelopathy Tropical
Spastic Paraparesis: Therapeutic Approach. *Viral Immunol.*, 5:2003.

MOREIRA, A.L.; SAMPAIO, E.P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; SMITH, K.A.;
KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha
by enhancing mRNA degradation. *J. Exp. Med.*, 177(6):1675-1680, 1993.

MOREIRA JUNIOR, E.D.; RIBEIRO, T.T.; SWANSON, P.; SAMPAIO FILHO, C.;
MELO, A.; BRITES, C.; BADARO, R.; TOEDTER, G.; LEE, H.; HARRINGTON
JUNIOR, W. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in
northeastern Brazil. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 6(8):959-963, 1993.

MORGAN, O.S.; RODGERS-JOHNSON, P.; MORA, C.; CHAR, G. HTLV-1 and
polymyositis in Jamaica. *Lancet*, 2(8673):1184-1187, 1989.

NAGAI, M.; JACOBSON, S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus
type I-associated myelopathy. *Curr. Opin. Neurol.*, 14(3):381-386, 2001.

NAGAI, M.; OSAME, M. Human T-cell lymphotropic virus type I and neurological
diseases. *J. Neurovirol.*, 9(2):228-235, 2003.

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(2):197-205, 2001.

NAKAGAWA, M.; NAKAHARA, K.; MARUYAMA, Y.; KAWABATA, M.; HIGUCHI, I.; KUBOTA, H.; IZUMO, S.; ARIMURA, K.; OSAME, M. Therapeutic trials in 200 patients with HTLV-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis. *J. Neurovirol.*, 2(5):345-355, 1996.

NAKAMURA, S.; NAGANO, I.; YOSHIOKA, M.; SHIMAZAKI, S., ONODERA, J.; KOGURE, K. Detection of tumor necrosis factor-alpha positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I associated myelopathy. *J. Neuroimmunol.*, 42(2):127-130, 1993.

NAVIKAS, V.; MATUSEVICIUS, D.; SODERSTROM, M.; PIRSKANEN, R.; FREDRIKSON, S.; LINK, H. The phosphodiesterase i.v. inhibitor rolipram in vitro reduces the numbers of MBP-reactive IFN-gamma and TNF-alpha mRNA expressing blood mononuclear cells in patients with multiple sclerosis. *Clin. Neuropharmacol.*, 21(4):236-244, 1998.

NEUNER, P.; KLOSNER, G.; POURMOJIB, M.; KNOBLER, R.; SCHWARZ, T. Pentoxifylline in vivo and in vitro down-regulates the expression of the intercellular adhesion molecule-1 in monocytes. *Immunology*, 90(3):435-439, 1997.

NEUNER, P.; KLOSNER, G.; SCHAUER, E.; POURMOJIB, M.; MACHEINER, W.; GRUNWALD, C.; KNOBLER, R.; SCHWARZ, A.; LUGER, T.A.; SCHWARZ, T. Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology*, 83(2): 262-267, 1994.

NIEWIESK, S.; DAENKE, S.; PARKER, C.E.; TAYLOR, G.; WEBER, J.; NIGHTINGALE, S.; BANGHAM, C.R. The transactivator gene of human T-cell leukemia virus type I is more variable within and between healthy carriers than patients with tropical spastic paraparesis. *J. Virol.*, 68(10):6778-6781, 1994.

NISHIMOTO, N.; YOSHIZAKI, K.; EIRAKU, N.; MACHIGASHIRA, K.; TAGOH, H.; OGATA, A.; KURITANI, T.; OSAME, M.; KISHIMOTO, T. Elevated levels of interleukin-6 in serum and cerebrospinal fluid of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Neurol. Sci.*, 97(2-3):183-193, 1990.

OKOCHI, K.; SATO, H.; HINUMA, Y. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang.*, 46(5): 245-253, 1984.

OSAME, M. Diagnosis and treatment of HTLV-I associated myelopathy. *Nippon Naika Gakkai Zasshi.* 79(3):261-265, 1990.

_____ Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *J. Neurovirol.*, 8(5):359-364, 2002.

OSAME, M.; IGATA, A.; MATSUMOTO, M.; TARA, M. HTLV-I-associated myelopathy. *Gan To Kagaku Ryoho*, 14(8):2411-2416, 1987.

OSAME, M.; USUKU, K.; IZUMO, S.; IJICHI, N.; AMITANI, H.; IGATA, A.; MATSUMOTO, M.; TARA, M. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*, 1(8488):1031-1032, 1986.

PARIDA, S.K.; GRAU, G.E. Role of TNF in immunopathology of leprosy. *Res. Immunol.*, 144(5):376-384, 1993.

PLUMELLE, Y. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) pathogenesis hypothesis. A shift of homologous peptides pairs, central nervous system (CNS)/HTLV-1, HTLV-1/thymus, thymus/CNS, in a thymus-like CNS environment, underlies the pathogenesis of HAM/TSP. *Med. Hypotheses*, 52(6):595-604, 1999.

POIESZ, B.J.; RUSCETTI, F.W.; GAZDAR, A.F.; BUNN, P.A.; MINNA, J.D.; GALLO, R.C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 77(12):7415-7419, 1980.

POPOVIC, M.; FLOMENBERG, N.; VOLKMAN, D.J.; MANN, D.; FAUCI, A.S.; DUPONT, B.; GALLO, R.C. Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-I or HTLV-II. *Science*, 226(4673):459-462, 1984.

RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; BACELLAR, °; CARVALHO, E.M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31(1):143-148, 1998.

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 1. *J. Virol.*, 64(11):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(9):3303-3314, 1997.

RIECKMANN, P.; WEBER, F.; GUNTHER, A.; MARTIN, S.; BITSCH, A.; BROOCKS, A.; KITZE, B.; WEBER, T.; BORNER, T.; POSER, S. Pentoxifylline, a phosphodiesterase inhibitor, induces immune deviation in patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 64(2):193-200, 1996.

ROBERT-GUROFF, M.; WEISS, S.H.; GIRON, J.A.; JENNINGS, A.M.; GINZBURG, H.M.; MARGOLIS, I.B.; BLATTNER, W.A.; GALLO, R.C. Prevalence of antibodies to HTLV-I, -II, and -III in intravenous drug abusers from an AIDS endemic region. *JAMA*, 255(22):3133-3137, 1986.

RODGERS-JOHNSON, P.; GAJDUSEK, D.C.; MORGAN, O.S.; ZANINOVIC, V.; SARIN, P.S.; GRAHAM, D.S. HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. *Lancet*, 2(8466):1247-1248, 1985.

ROMAN, G.C.; OSAME, M. Identity of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. *Lancet*, 1(8586):651, 1988.

ROSENBERG, A.R.; DELAMARRE, L.; PIQUE, C.; PHAM, D.; DOKHELAR, M.C. The ecto-domain of the human T-cell leukemia virus type 1 TM glycoprotein is involved in postfusion events. *J. Virol.*, 71(10):7180-7186, 1997.

ROSS, S.E.; WILLIAMS, R.O.; MASON, L.J.; MAURI, C.; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L.; MAL-FAIT, A.M.; MAINI, R.N.; FELDMANN, M. Suppression of TNF-alpha expression, inhibition of Th1 activity, and amelioration of collagen induced arthritis by rolipram. *J. Immunol.*, 159(12):6253-6259, 1997.

RYFFEL, B.; BROCKHAUS, M.; GREINER, B.; MIHATSCH, M.J.; GUDAT, F. Tumour necrosis factor receptor distribution in human lymphoid tissue. *Immunology*, 74(3):446-452, 1991.

SAKAI, J.A.; NAGAI, M.; BRENNAN, M.B.; MORA, C.A.; JACOBSON, S. In vitro spontaneous lymphoproliferation in patients with human T-cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease: predominant expansion of CD8+ T cells. *Blood*, 98(5): 1506-1511, 2001.

SAMPAIO, E.P.; HERNANDEZ, M.O.; CARVALHO, D.S.; SARNO, E.N. Management of erythema nodosum leprosum by thalidomide: thalidomide analogues inhibit *M. leprae*-induced TNF alpha production in vitro. *Biomed. Pharmacother.*, 56(1): 13-19, 2002.

SAMPAIO, E.P.; MORAES, M.O.; NERY, J.A.; SANTOS, A.R.; MATOS, H.C.; SARNO, E.N. Pentoxifylline decreases in vivo and in vitro tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production in lepromatous leprosy patients with erythema nodosum leprosum (ENL). *Clin. Exp. Immunol.*, 111(2):300-308, 1998.

SAMPAIO, E.P.; KAPLAN, G.; MIRANDA, A.; NERY, J.A.; MIGUEL, C.P.; VIANA, S.M.; SARNO, E.N. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J. Infect. Dis.*, 168(2):408-414, 1993.

SANDBORN, W.J.; TARGAN, S.R. Biologic therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 122(6):1592-1608, 2002.

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(1):7, 2004.

SATO, H.; OKOCHI, K. Transmission of human T-cell leukemia virus (HTLV-I) by blood transfusion: demonstration of proviral DNA in recipients' blood lymphocytes. *Int. J. Cancer*, 37(3):395-400, 1986.

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(7):2932-2938, 1996.

SCHREIBER, G.B.; BUSCH, M.P.; KLEINMAN, S.H.; KORELITZ, J.J. The risk of transfusion transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N. Engl. J. Med.*, 334(26):1685-1690, 1996.

SEGURADO, A.A.; BIASUTTI, C.; ZEIGLER, R.; RODRIGUES, C.; DAMAS, C.D.; JORGE, M.L.; MARCHIORI, P.E. Identification of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) sub-types using restricted fragment length polymorphism in a cohort of asymptomatic carriers and patients with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from Sao Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97(3):329-333, 2002.

SEIKI, M.; HATTORI, S.; HIRAYAMA, Y.; YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80(12):3618-3622, 1983.

SHEREMATA, W.A.; BENEDICT, D.; SQUILACOTE, D.C.; SAZANT, A.; DE FREITAS, E. High dose zidovudine induction in HTLV-I-associated myelopathy: safety and possible efficacy. *Neurology*, 43(10):2125-2129, 1993.

SHIBAYAMA, K.; NAKAMURA, T.; NAGASATO, K.; SHIRABE, S.; TSUJIHATA, M.; NAGATAKI, S. Interferon-alpha treatment in HTLV-I associated myelopathy. Studies of clinical and immunological aspects. *J. Neurol. Sci.*, 106(2):186-192, 1991.

SHIRABE, S.; NAKAMURA, T.; TSUJINO, A.; NISHIURA, Y.; FURUYA, T.; GOTO, H.; SUENAGA, A.; NAKANE, S.; YOSHIMURA, T.; NAGATAKI, S. Successful application of pentoxifylline in the treatment of HTLV-I associated myelopathy. *J. Neurol. Sci.*, 151(1): 97-101, 1997.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. 1991.

STUVER, S.O.; TACHIBANA, N.; OKAYAMA, A.; ROMANO, F.; YOKOTA, T.;

MUELLER, N. Determinants of HTLV-1 seroprevalence in Miyazaki Prefecture, Japan: a cross-sectional study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 5(1):12-18, 1992.

STUYT, R.J.; NETEA, M.G.; GEIJTENBEEK, T.B.; KULLBERG, B.J.; DINARELLO, C.A.; VAN DER MEER, J.W. Selective regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression by interleukin-18 and interleukin-12 on human monocytes. *Immunology*, 110(3):329-334, 2003.

SUN, S.C.; ELWOOD, J.; BERAUD, C.; GREENE, W.C. Human T-cell leukemia virus type I Tax activation of NF-kappa B/Rel involves phosphorylation and degradation of I kappa B alpha and RelA (p65)-mediated induction of the c-rel gene. *Mol. Cell. Biol.*, 14(11):7377-7784, 1994.

SUNDARAM, R.; BEEBE, M.; KAUMAYA, P.T. Structural and immunogenicity analysis of chimeric B-cell epitope constructs derived from the gp46 and gp21 subunits of the envelope glycoproteins of HTLV-1. *J. Pept. Res.*, 63(2):132-140, 2004a.

SUNDARAM, R.; LYNCH, M.P.; RAWALE, S.V.; SUN, Y.; KAZANJI, M.; KAUMAYA, P.T. De novo design of peptide immunogens that mimic the coiled coil region of human T-cell leukemia virus type-1 glycoprotein 21 transmembrane subunit for induction of native protein reactive neutralizing antibodies. *J. Biol. Chem.*, 279(23): 24141-24151, 2004b.

SURYAPRASAD, A.G.; PRINDIVILLE, T. The biology of TNF blockade. *Autoimmun. Rev.*, 2(6):346-357, 2003.

TAKENOUCI, N.; YAMANO, Y.; USUKU, K.; OSAME, M.; IZUMO, S. Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Neurovirol.*, 9(1):29-35, 2003.

TAM, F.W.; SMITH, J.; AGARWAL, S.; KARKAR, A.M.; MOREL, D.; THOMPSON, E.M. Pusey CD. Type IV phosphodiesterase inhibitor is effective in prevention and treatment of experimental crescentic glomerulonephritis. *Nephron*, 84(1): 58-66, 2000.

TENDLER, C.L.; GREENBERG, S.J.; BURTON, J.D.; DANIELPOUR, D.; KIM, S.J.; BLATTNER, W.A.; MANN, A.; WALDMANN, T.A. Cytokine induction in HTLV-I associated myelopathy and adult T-cell leukemia: alternate molecular mechanisms underlying retroviral pathogenesis. *J. Cell. Biochem.*, 46(4):302-311, 1991.

TENDLER, C.L.; GREENBERG, S.J.; BLATTNER, W.A.; MANNS, A.; MURPHY, E.; FLEISHER, T.; HANCHARD, B.; MORGAN, O.; BURTON, J.D.; NELSON, D.L., et al. Transactivation of interleukin 2 and its receptor induces immune activation in human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy: pathogenic implications and a rationale for immunotherapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87(13):5218-5222, 1990.

TRACEY, K.J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu. Rev. Med.*, 45:491-503, 1994.

TSUJINO, A.; NAKAMURA, T.; NISHIURA, Y.; SHIRABE, S.; FURUYA, T.; GOTO, H.; KAWAKAMI, A.; EGUCHI, K.; NAGATAKI, S. Pentoxifylline down regulates adhesion molecule expression and inflammatory cytokine production in cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neuro-Immunol.*, 73(1-2):191-196, 1997.

UCHIYAMA, T. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. *Annu. Rev. Immunol.*, 15:15-37, 1997.

USUKU, K.; SONODA, S.; OSAME, M.; YASHIKI, S.; TAKAHASHI, K.; MATSUMOTO, M.; SAWADA, T.; TSUJI, K.; TARA, M.; IGATA, A. HLA haplotype linked high immune re-sponsiveness against HTLV-I in HTLV-I-associated myelopathy: comparison with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Ann. Neurol.*, 23(Suppl):S143-S150, 1988.

USUKU, K.; NISHIZAWA, M.; MATSUKI, K.; TOKUNAGA, K.; TAKAHASHI, K.; EIRAKU, N.; SUEHARA, M.; JUJI, T.; OSAME, M.; TABIRA, T. Association of a

particular aminoacid sequence of the HLA-DR beta 1 chain with HTLV-I associated myelopathy. *Eur. J. Immunol.*, 20(7):1603-1606, 1990.

VANDENABEELE, P.; DECLERCQ; YAERT, R.; FIERS, W. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol.*, 5(10):392-399, 1995.

159. VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.*, 10:411-452, 1992.

VERNANT, J.C. T-lymphocyte alveolites tropical spatic paraparesis and Sjögren syndrome. *Lancet*, 1(8578): 177, 1998.

WERTHEIMER, E.; SASSON, S.; CERASI, E.; BEN-NERIAH Y. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 belongs to the glucose regulated protein family of stress-inducible proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(6):2525-2529, 1991.

WOLFE, N.D.; HENEINE W.; CARR, J.K.; GARCIA, A.D.; SHANMUGAM, V.; TAMOUFE, U.; TORIMIRO, J.N.; PROSSER, A.T.; LEBRETON, M.; MPOUDI-NGOLE, E.; MCCUTCHAN, F.E.; BIRX, D.L.; FOLKS, T.M.; BURKE, D.S.; SWITZER, W.M. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(22):7994-7999, 2005.

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(6):2110-2114, 1992.

YAMANO, Y.; NAGAI, M.; BRENNAN, M.; MORA, C.A.; SOLDAN, S.S.; TOMARU, U.; TA-KENOUCHE, N.; IZUMO, S.; OSAME M, J. S. Correlation of human T-cell lym-photropic 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.

YAMASHITA, M.; IDO, E.; MIURA, T.; HAYAMI, M. Molecular epidemiology of HTLV-I in the world. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 13(Suppl 1): S124-S131, 1996.

YE, J.; XIE, L.; GREEN, P.L. Tax and overlapping rex sequences do not confer the distinct

transformation tropisms of human T-cell leukemia virus types 1 and 2. *J. Virol.*, 77(14):7728-7735, 2003.

YOSHIDA, M. Molecular biology of HTLV-I: recent progress. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, 13 (Suppl 1):S63-S68, 1996.

YOSHIDA, M.; MIYOSHI, I.; HINUMA, Y. A retrovirus from human leukemia cell lines: its isolation, characterization, and implication in human adult T-cell leukemia (ATL). *Princess Takamatsu Symp.*, 12:285-294, 1982.

YOSHIDA, M.; OSAME, M.; USUKU, K.; MATSUMOTO, M.; IGATA, A. Viruses detected in HTLV-I-associated myelopathy and adult T-cell leukaemia are identical on DNA blotting. *Lancet*, 1(8541):1085-1086, 1987.

*De acordo com a norma técnica ABNT NBR 6023 de 8/2002

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)