1. **INTRODUÇÃO**

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

A Leucemia de Células T do Adulto (ATL) foi inicialmente descrita em 1977 no Japão. Na década de 80, um retrovírus denominado primeiramente "Vírus da Leucemia de Células T do Adulto do tipo 1", hoje conhecido como Vírus Linfotrópico Humano de Células T do tipo 1 (HTLV1), foi isolado e definido como agente etiológico da ATL (Gallo, 2005; Matsuoka, 2005).

A transmissão deste vírus ocorre de variadas formas, porém requer contato direto entre linfócitos T infectados. A literatura descreve a contaminação vertical via amamentação, sexual, endovenosa por agulhas contaminadas e transfusão de sangue e hemoderivados (Matsuoka, 2005; Nicot, 2005). O Brasil tem prevalência moderadamente elevada, abrigando o maior número absoluto de indivíduos infectados no mundo, principalmente no norte do país. (Nobre *et al*., 2005). Sabe-se que o estado de portador por longo período pode levar ao desenvolvimento de doenças graves hoje sabidamente relacionadas ao vírus (Matsuoka, 2005).

A ATL é uma doença maligna, rara e muito agressiva, que se desenvolve após longo período de latência em um indivíduo infectado pelo HTLV1 (Yasunaga e Matsuoka, 2003; Matsuoka, 2003). Decorre da expansão clonal de linfócitos T CD4 infectados e transformados pelo vírus. Clinicamente contempla quatro subtipos de características e evoluções peculiares (Matsuoka, 2005) e os fatores determinantes de seu desenvolvimento permanecem pouco conhecidos; porém sabe-se que a proteína viral Tax está intimamente relacionada com a imortalização das células infectadas pelo HTLV1 (Sasaki *et al*, 2005).

Durante sua evolução, as células da ATL invadem os tecidos, sendo esta uma importante característica clínica da doença. Este potencial invasivo é determinado pela capacidade de interação entre as células leucêmicas e o endotélio (Bazarbachi *et al*., 2004). A molécula de adesão E-selectina é descrita como principal mediador de aderência entre as células leucêmicas e as células endoteliais (Raffi *et al*., 2002), porém outras moléculas mediadoras de adesão, a exemplo da proteína supressora tumoral do câncer de pulmão 1 (TSLC 1), também podem estar hiperexpressas na ATL (Sasaki *et al*., 2005).

Com a descoberta da elevada capacidade adesiva das células transformadas, novas vertentes de estudo foram surgindo. Dados sugeriam que a angiogênese poderia ter papel importante na patogênese da ATL. Estudos demonstraram que as células infectadas pelo HTLV1 secretam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) em conseqüência da ativação da transcrição induzida pela proteína Tax viral. Nestes estudos, linfócitos do grupo controle não foram capazes de secretar VEGF (El-Sabban *et al*., 2002). O VEGF induz a diferenciação das células endoteliais progenitoras, sua interação direta com as células do estroma e regula a expansão deste grupo de células colaborando para a formação de vasos tumorais funcionais (Podar e Anderson, 2005).

Assim, estudiosos tentam entender melhor o papel das células endoteliais circulantes (CECs), progenitoras (CEPs) ou maduras (CEMs), como marcadores biológicos de prognóstico e de gravidade de lesão

vascular na ATL (Khan *et al*., 2005; Zhang *et al*., 2005). Estudos prévios já revelaram que são encontradas em maior número no sangue periférico (SP) de pacientes com determinado tipo de câncer (Mancuso *et al*., 2001).

CEPs quando atraídas a locais de angiogênese e de lesão vascular, participam do processo de neovascularização tanto fisiológica quanto patológica (Raffi *et al*., 2002; Hristov *et al*., 2003; Bazarbachi *et al*., 2004). Têm maior capacidade angioblástica *in vitro* e podem representar marcadores biológicos de angiogênese e de resposta à terapia antitumoral (Blann *et al.,* 2005). Pesquisas com mieloma multiplo (MM) já correlacionam um elevado número de CECs diretamente com atividade de doença. Frente a estes achados, drogas antiangiogênicas vêm sendo empregadas com bons resultados na terapia antitumoral (Zhang *et al*., 2005).

Apesar da maioria dos pacientes infectados pelo HTLV1 permanecer assintomática, a determinação de marcadores biológicos de evolução clínica e dos subtipos de ATL é importante para direcionar a terapêutica específica. Com a finalidade de averiguar a relação entre CECs e progressão de doença, realizamos o estudo para quantificar estas células em portadores assintomáticos do HTLV1. Este é o primeiro trabalho de quantificação de CECs como marcador indireto de atividade angiogênica em portadores assintomáticos do vírus.

2. OBJETIVO

1. Quantificar as células endoteliais circulantes progenitoras, maduras e ativadas em portadores assintomáticos do HTLV1 por citometria de fluxo, comparando os resultados com indivíduos saudáveis.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Histórico do HTLV1

Após 70 anos de pesquisa, no sudoeste do Japão, pesquisadores descreveram uma leucemia constituída por células pleomórficas e membrana nuclear irregular que foi denominada em 1977 “Leucemia de células T do adulto” (Magrath, 1997). Em 1980 nos EUA, Poiesz *et al* descreveram um vírus denominado HTLV1 em uma linhagem de células linfóides T de pacientes com linfoma de células T cutâneo (LCTC), documentando enfim a primeira associação entre um retrovírus e o câncer em humanos.

Um ano depois, em continuidade aos estudos, pesquisadores japoneses enviaram soro de portadores de ATL para pesquisadores americanos. Estes encontraram anticorpos anti-HTLV1 presente em todas as amostras. No mesmo período, os japoneses conseguiram isolar uma partícula viral em uma linhagem celular obtida por cultivo de células de ATL com linfócitos humanos, que recebeu o nome de “Vírus da Leucemia de Células T do Adulto (ATLV)”. No mesmo ano, Gallo *et al* demonstraram que as amostras dos pacientes com ATL possuíam proteínas semelhantes às p24, p19 e à transcriptase reversa (RT) do HTLV1 purificado, além de evidências de integração do pró-vírus HTLV1 à célula leucêmica da ATL. Com estes dados foi possível suportar a associação causal entre o HTLV1 e a ATL. Passado um tempo, demonstrou-se que o ATLV e o retrovírus isolado por Poiesz eram os mesmos, adotando-se por fim o nome HTLV1 (Gallo, 2005; Yoshida e Jeang, 2005).

3.2 Características epidemiológicas do HTLV1

Estima-se que 10 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV1 no mundo, especialmente no Japão, África, Caribe e América do Sul (Matsuoka, 2005). Com 2,5 milhões de indivíduos infectados, o Brasil é o país com maior número absoluto de portadores com predomínio do sexo feminino, nos estados da Bahia, Pernambuco e Pará. A triagem sorológica para HTLV nos bancos de sangue brasileiros se tornou obrigatória pela portaria 1376 de 19 de novembro de 1993 (Proietti, 2000).

O HTLV1 é transmitido via vertical, de mãe para filho, principalmente pelo leite materno e pelas vias parenteral e sexual (Matsuoka, 2005). A chance de transmissão via amamentação é de 20% e está associada à alta carga pró-viral, a altos títulos de anticorpos maternos e amamentação prolongada (Li *et al*., 2004). A transmissão via mucosa não induz resposta imune anti-HTLV1 em estágio precoce da infecção, permitindo a expansão de células infectadas e elevação da carga pró-viral. A transmissão intra-uterina e periparto são menos importantes (Kannagi *et al*., 2004).

A via parenteral é a forma mais eficaz de transmissão com risco de soro conversão após transfusão do produto contaminado de 40% a 60%. Concentrado de granulócitos, hemácias e plaquetas são mais infectantes que o plasma. O compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas também constitui importante forma de transmissão (Proietti *et al*., 2005).

A maioria dos infectados permanece como portador assintomático e 3% a 5 % irão desenvolver doenças associadas ao HTLV1 em um período de 10 a 40 anos (Azran *et al*., 2004; Semmes *et al*., 2005). As principais

doenças são a ATL e a Mielopatia Associada ao HTLV1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP) (Proietti, 2000). Apesar de terem como causa o mesmo agente, a fisiopatologia é distinta, sendo rara a coexistência de ambas (Barmak *et al*., 2003). Na infância outras manifestações podem ocorrer, como uma forma de eczema cutâneo grave denominado dermatite infecciosa associada ao HTLV1. Estima-se que a infecção pelo HTLV1 aumente em até 1000 vezes o risco de desenvolvimento de neoplasia de linfócito T (Matsuoka,2005).

3.3 Fisiopatologia da infecção pelo HTLV1

A história natural da infecção pelo HTLV1 não está completamente elucidada, principalmente porque o tempo decorrido entre infecção e início da sintomatologia é longo. Acredita-se que este fato pode estar relacionado ao modo de transmissão do vírus. A via de transmissão parenteral estaria associada à HAM/TSP e a enteral à ATL. Experimentos em ratos demonstraram que a exposição ao vírus via mucosa associa-se a ausência de resposta imune celular e humoral anti-HTLV1, permitindo a sobrevivência, a proliferação e a eventual transformação leucêmica da célula infectada (Barmak *et al*., 2003).

Apesar de ser transmitido entre humanos da mesma forma que o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV), determinadas vias de transmissão são menos eficientes. A infecção por partículas virais do HTLV1 livres no plasma *in vitro* é errática e difícil, usualmente a propagação do vírus depende do contato entre as células (Magrath, 1997).

In vitro, várias células podem ser infectadas pelo HTLV1, a exemplo de linfócitos B, fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais e macrófagos; porém *in vivo,* as principais células infectadas são os linfócitos T CD4. Após a infecção, o vírus adere-se e penetra nas células do hospedeiro através da interação entre a glicoproteína de superfície viral gp46 e o transportador de glicose 1 (glut-1) da célula alvo do hospedeiro (Coskun, 2005).

Quando a célula infectada entra em contato com a não infectada, ocorre polarização do centro organizador dos microtúbulos na região da junção intercelular formando-se uma sinapse. Em seguida, há um acúmulo de proteínas do genoma RNA viral que se transferem para a célula alvo (Taylor e Matsuoka, 2005).

Ao entrar na célula, a transcriptase reversa do capsídeo viral sintetiza DNA viral a partir do RNA genômico viral. Este DNA viral é transportado para o núcleo da célula alvo e se integra ao genoma da célula do hospedeiro de forma aleatória (Yoshida, 2005). O genoma do HTLV1 é constituído por um grupo específico de genes que codificam proteases, polimerases, genes do envelope, e pela região codificadora de produtos específicos do HTLV1 (pX) que codifica genes acessórios como o gene Tax, essencial à ativação e à expressão de genes virais fundamentais à replicação viral e à transformação da célula do hospedeiro (Mahieux e Gessain, 2003). Em seguida há replicação do genoma, transcrição gênica, tradução de proteínas virais, fechando-se o ciclo com a formação de um novo vírus (Barmak *et al.,* 2003).

3.4 Fisiopatologia da transformação celular em ATL

A transformação de células T pelo HTLV1 resulta em proliferação clonal contínua de linfócitos T CD4 mediada pela Tax. Esta proteína induz a síntese de interleucina 2 (IL-2) e de seu receptor (IL-2R) (Magrath, 1997) e bloqueia genes reparadores de DNA e indutores de apoptose (Taylor e Matsuoka, 2005).

Seguindo a infecção primária, ocorre elevação do número de cópias do HTLV1 por infecção *de novo* e proliferação das células infectadas. As células Tax+ entram diretamente na fase G1 do ciclo celular por ativação da transcrição de ciclinas D e E, e expressão de kinases dependentes de ciclina (CDKs 4/6 e CDK 2). A Tax pode reprimir a transcrição dos inibidores de CDKs, impedindo sua ligação à CDK4 e CDK6. Na fase G1, pode ligar-se diretamente à forma hipofosforilada do gene do retinoblastoma (Rb), facilitando a degradação do proteassoma, liberando a célula deste ponto de restrição. Na fase S do ciclo celular, a Tax inibe a apoptose ao ativar a expressão da p21 independente da p53. A p21 se liga ao complexo ciclina D-CDK4/6, CDK2, estabilizando-o, permitindo a progressão do ciclo celular. A Tax também inativa a p53 dificultando reparos ao DNA (Marriot e Semmes, 2005). Durante a mitose, a Tax liga-se e ativa prematuramente o complexo promotor de anáfase (*APC*), promovendo a degradação de securina, permitindo a separação inapropriada das cromátides irmãs, causando aneuploidia. Embora a Tax interfira em várias funções celulares, não há evidências de que exerça danos diretos ao DNA. Há evidências de que possa induzir expressão de

genes críticos ao crescimento e à proliferação do linfócito T, incluindo fatores de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina 15 (IL-15) e a cadeia α do receptor de IL-2 (Barmak *et al*., 2003).

O surgimento da ATL pode ser influenciado pelo hospedeiro e pelo meio ambiente. O genótipo do HLA do hospedeiro e a carga pró-viral do HTLV1 podem predizer o risco de desenvolvimento da ATL. Indivíduos com HLA-A*26, HLA-B*4002, HLA-B*4006 e HLA-(B4801) estão mais propensos a desenvolverem ATL pois são incapazes de reconhecer a proteína Tax e de gerar linfócitos T citotóxicos anti-Tax, facilitando a transformação dos linfócitos T infectados pelo HTLV1 (Proietti *et al.,* 2005).

3.4.1 ATL

A ATL é uma doença linfoproliferativa de células T pós-tímicas ou maduras, predominantemente de linfócitos T CD4, caracterizada pela integração clonal completa ou defectiva do pró-vírus HTLV1 nas células tumorais (Magrath, 1997).

3.4.2 Apresentação Clínica

Clinicamente agressiva, tem alta freqüência de infiltração cutânea e visceral (Bazarbachi *et al*., 2004). A ATL é classificada em quatro subtipos clínicos: *smoldering*, aguda, crônica e linfomatosa (Van Zaanen e Pegels, 2002; Levine *et a*l., 1994). A forma aguda é a mais comum (60% dos casos) e se caracteriza por extrema agressividade, leucocitose acentuada com

células linfóides circulantes, hipercalcemia, com ou sem lesões de pele. A forma crônica (10%) é caracterizada por persistente linfocitose T e pouco ou nenhum envolvimento de órgão alvo. A forma linfomatosa é indistinta dos outros tipos de linfoma não Hodgkin (LNH) em relação à clínica e histopatologia e representam 22% dos casos de ATL. Na forma *smoldering* (8%), há pelo menos 5% de células linfóides T anômalas circulantes sem anormalidade laboratorial ou clínica, exceto por infiltração de pele (Levine *et al.,* 1994; Pombo de Oliveira *et al*., 1999).

3.4.3 Critério diagnóstico

Os critérios diagnósticos da ATL são definidos pela presença de linfócitos malignos morfologicamente alterados na circulação, anticorpo anti-HTLV1 no soro do paciente e demonstração de integração clonal do pró-vírus HTLV1 na célula pelo método de Southern blot ou de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Takatsuki, 2005). Todos os casos devem ter fenótipo T (Levine *et al.,* 1994).

À citologia, as células linfóides T circulantes apresentam baixa relação N/C, núcleo convoluto e cromatina pouso densa denominadas de “flower cell”, e/ou pequenos linfócitos maduros de núcleo lobulado (Magrath, 1997). (Figura 1)

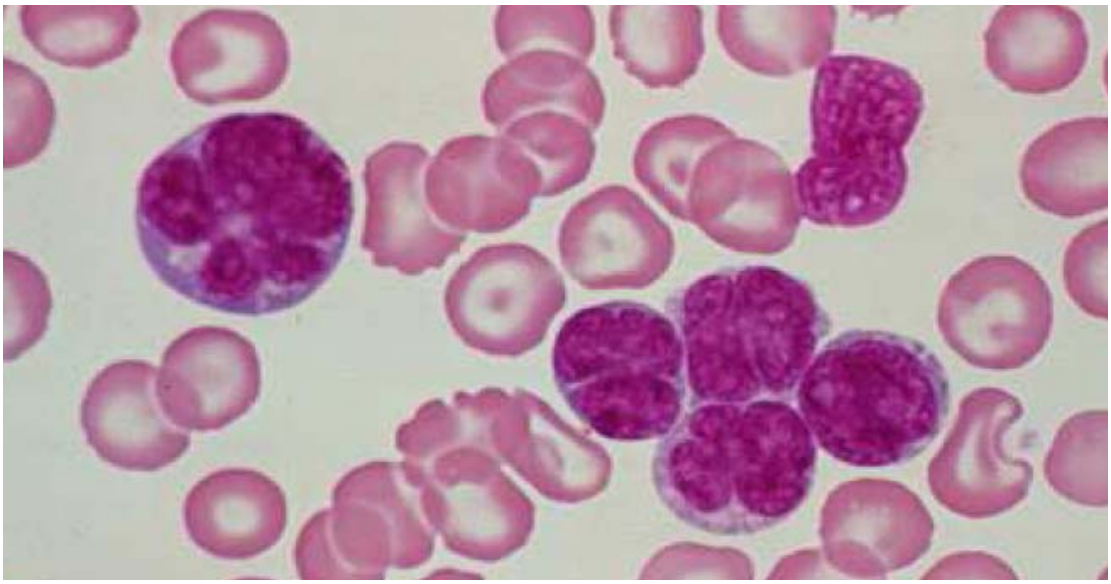


Figura 1: Distensão de sangue periférico em aumento de 100x evidenciando *flower cells* de paciente com ATL forma aguda acompanhado no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As células linfóides malignas expressam antígenos T (CD2, CD3, CD4, CD5) de superfície e marcadores de ativação celular (CD25 e HLA DP, DQ e DR). Em geral, perdem o antígeno CD7. Os casos de fenótipo TCD8+/CD4 -,TCD4+/CD8+ são raros (Magrath, 1997). (Figura 2)

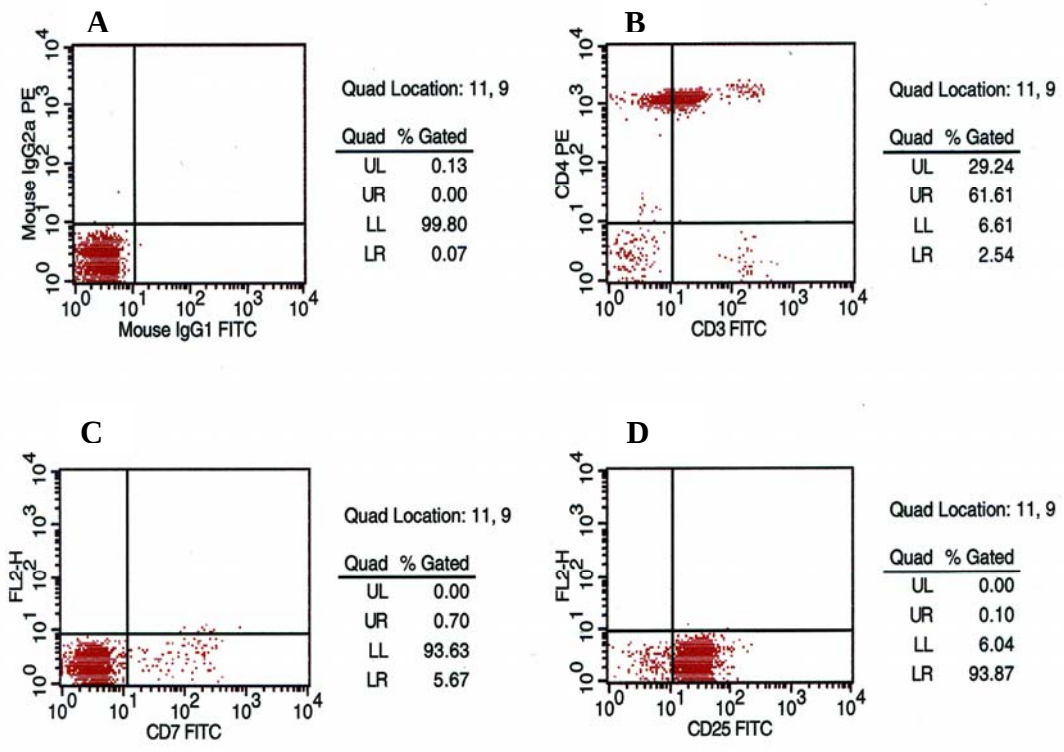


Figura 2: Citogramas apresentando controle isotípico (A) e expressão dos antígenos CD3 e CD4 (B), CD7 (C) e CD25 (D) em paciente com ATL forma aguda acompanhado no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Observa-se expressão anormal de CD3 em fraca intensidade média de fluorescência.

Atualmente os critérios diagnósticos mais comumente utilizados são os elaborados por Levine *et al* em 1994. (Tabela1)

Tabela 1 - Critérios para definição de ATL

Definição da ATL	
Critérios Clínicos	
Hipercalcemia	1 ponto
Envolvimento de pele	1 ponto
Fase leucêmica (mais que 2% de células linfóides anormais)	1 ponto
Critérios Laboratoriais	
Presença de anticorpos anti-HTLV-I	2 pontos
Células T com fenótipo aberrante	2 pontos
Integração monoclonal do HTLV-I ao genoma da célula tumoral	2 pontos
Expressão do receptor α da IL2	1 ponto
Classificação ATL	
Clássica	≥7 pontos
Provável	5 ou 6 pontos
Possível	3 ou 4 pontos
Inconsistente com ATL	<3 pontos

Fonte: Levine *et al.* 1994.

Nenhuma alteração cromossômica específica foi associada a ATL. Na maioria das vezes há anormalidades múltiplas e inespecíficas como trissomia do cromossomo 3 ou do cromossomo 7, anormalidades dos cromossomos 6 e 14 e perda do cromossomo X . O diagnóstico definitivo é feito pela demonstração da integração clonal do pró-vírus HTLV1 na célula tumoral por Southern blot ou por PCR (Bazarbachi e Hermine, 2001).

3.4.4 Prognóstico

Ambas, forma crônica e *smoldering,* podem evoluir para a forma aguda ou linfomatosa como progressão de doença. A subclassificação da ATL é crítica para a decisão terapêutica. A forma *smoldering* e 30% dos casos da forma crônica têm prognóstico relativamente bom mesmo sem

terapêutica, e o tratamento das formas agressivas permanece desapontador (Bazarbachi e Hermine, 2001). A sobrevida média de uma coorte brasileira foi de 5,4 meses para o a forma aguda, 9,3 meses para a forma linfomatosa, 46,3 meses para a smoldering e 37,8 meses para a crônica (Proietti, 2000).

3.4.5 Tratamento

Até o momento não existe tratamento curativo para ATL. Além da resistência das células malignas à quimioterapia, a imunodeficiência sobreposta à malignidade dificulta o tratamento adequado (Bazarbachi e Hermine, 2001; Matsuoka, 2005).

A carga pró-viral é variável entre os indivíduos infectados pelo vírus HTLV1 e maior nos sintomáticos. A carga pró-viral do HTLV1 dos portadores é influenciada pelo uso de antiretrovirais como a zidovudina e lamivudina, retardando a evolução da doença. O mecanismo de ação destas medicações decorre de seu efeito inibidor e citostático sobre a transcriptase reversa, reduzindo a carga pró-viral do HTLV1 e a proliferação celular (Machuca *et al*., 2001).

As formas aguda e linfomatosa não têm boa resposta com os esquemas de quimioterapia habituais para linfomas agressivos. Uma taxa de remissão completa (RC) de 40% foi obtida no Japão com esquemas diferentes dos convencionais, porém houve elevada taxa de mortalidade. Novos agentes antineoplásicos como a deoxicoformicina, irinotecan e

inibidores da topoisomerase II foram testados, mas com resultados pouco relevantes (Bazarbachi e Hermine, 2001).

Na forma *smoldering*, a quimioterapia não traz grandes benefícios, além de piorar a imunodeficiência. Nenhum tratamento parece prevenir a evolução para formas mais agressivas da ATL. Evidências, porém, sugerem que resultados positivos podem ser alcançados quando se associa o análogo de nucleosídeo zidovudina ao alfa-interferon (Kchour *et al*., 2007).

Alguns estudos demonstraram que pacientes com ATL têm carga pró-viral alta e elevados níveis plasmáticos de VEGF quando comparados a portadores assintomáticos do vírus, de forma que o uso de drogas antiangiogênicas pode ser factível neste grupo de pacientes (Kchour *et al.,* 2008).

3.5 O papel do sistema vascular no desenvolvimento da ATL

Uma nova vertente de estudos científicos surgiu com a descoberta de que pacientes com ATL e HAM/TSP apresentam altos níveis plasmáticos de fatores angiogênicos funcionais, destacando assim a importância do sistema vascular no mecanismo das doenças relacionadas ao HTLV1. Durante as últimas três décadas, várias proteínas e citocinas angiogênicas ativadoras da proliferação e migração de células endoteliais foram descritas. Somente em 1989 o VEGF, talvez o mais importante fator de crescimento angiogênico, foi clonado (Aboudola e Kini, 2005).

Estudos evidenciaram que células transformadas pelo HTLV1 secretam altos títulos de VEGF e bFGF devido à ativação transcricional Tax-dependente do gene VEGF. Níveis elevados de VEGF contribuem para a proliferação de células HTLV1 infectadas por estimulação autócrina. Possivelmente existe ligação entre altos níveis de VEGF e envolvimento extralinfonodal em ATL. Seu potencial invasivo é determinado pela capacidade de interação entre células leucêmicas e endotélio. A interação entre células de ATL e células endoteliais induzem a síntese, pelas células endoteliais, de metaloproteinases da matriz (MMPs) funcionais. A atividade de gelatinase das MMPs degrada a membrana basal subendotelial permitindo a retração das células endoteliais e o extravasamento das células leucêmicas do leito vascular (Bazarbachi *et al*., 2004). (Figura 3)

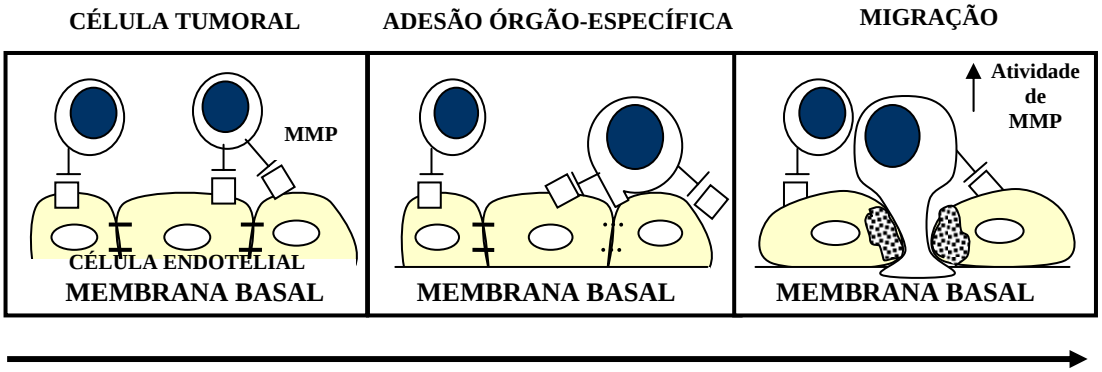


Figura 3 – Modelo de extravasamento da célula neoplásica da ATL (Baseado em Bazarbachi *et al*, 2004).

No HAM/TSP, mecanismo angiogenêse-símile desencadeado pelas células infectadas pelo HTLV1 pode ser responsável pela passagem das mesmas através da barreira hematoencefálica comprometendo o sistema nervoso central (SNC) (Al-Fahim *et al*., 1999; Bazarbachi *et al*., 2004).

Em 1993, demonstrou-se que fatores angiogênicos VEGF-símile produzidos por células tumorais promovem a formação de novos vasos patológicos a partir do recrutamento de precursores endoteliais de elevada capacidade proliferativa provenientes da medula óssea (MO) (Podar e Anderson, 2005; Gupta e Zhang, 2005). Com isso, a identificação e a quantificação de células hemangiogênicas circulantes passaram a ser observadas como possível marcador biológico de risco de metástase e de resposta terapêutica (Kopp *et al*., 2006).

3.6 Visão histórica da heterogeneidade vascular

Durante 1500 anos, uma teoria baseada em dados de Hipócrates e Galen sobre o sistema vascular sinalizava a existência de dois sistemas distintos entre si: o venoso e o arterial. Galen, porém, dizia que as artérias continham “ar e espíritos vitais”, e as veias conduziam o sangue formado pelo fígado. Em 1628, William Harvey derrubou esta hipótese. Com experimentos realizados em caninos, Harvey demonstrou que artérias e veias possuem íntima ligação por estarem conectadas entre si (Aird, 2007a).

Com a evolução científica e da microscopia eletrônica, Marcelo Malpighi foi o primeiro a visualizar os capilares sanguíneos em 1661. O termo “endotélio” surgiu em 1865 pelo anatomista Wilhelm His ao diferenciar a camada que revestia internamente as cavidades do organismo, do epitélio; e sua unidade anátomo-funcional: a célula endotelial. Nas décadas de 1950 e 1960, foram identificadas características

distintas que denotam a heterogeneidade estrutural e molecular das células endoteliais, surgindo assim uma nova era da biologia celular humana (Aird, 2007a; 2007b).

3.7 Vasculogênese e Angiogênese

A formação do sistema vascular e sanguíneo durante a embriogênese humana possui íntima ligação. Os dois sistemas originam-se do progenitor comum denominado hemangioblasto (Ribatti, 2004; Hristov *et al.*, 2003). Nesta fase, o suporte nutricional tecidual é feito por um sistema vascular intacto, capaz de liberar elementos essenciais ao tecido neoformado (Fidler e Ellis, 2004; Khakoo e Finkel, 2005). A diferenciação *in situ* de CEPs embrionárias conhecidas como angioblastos em células endoteliais maduras é denominada de *vasculogênese* (Rumpold *et al*. 2004; Khakoo e Finkel, 2005; Ingram *et al.,* 2005).

A formação de grupos isolados de hemangioblastos (ilhotas) e a subseqüente diferenciação em angioblastos e células progenitoras hematopoiéticas, inicia a vasculogênese propriamente dita (Lamping, 2007). Neste estágio, sinais provenientes de células progenitoras hematopoieticas sob a forma de citocinas como VEGF, fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e angiopoietinas, são essenciais ao crescimento vascular. A fusão de múltiplas “ilhotas” gera vasos sangüíneos primitivos pelo seu remodelamento em estruturas tubulares que constroem o microambiente do plexo capilar primário. Ao final da formação vascular, ocorre a deposição de CEMs sobre a superfície interna dos vasos,

constituindo uma barreira entre o fluxo sanguíneo e a matriz subendotelial imprescindível para a manutenção da homeostasia sanguínea (Zammaretti e Zisch, 2005).

Após o estabelecimento do sistema vascular propriamente dito, o desenvolvimento de novos vasos sangüíneos ocorre secundariamente à expansão das células endoteliais pós capilares ou à maturação e posterior neoformação de condutos colaterais derivados de artérias de maior calibre pré-existentes (Lamalice *et al*., 2007). Este processo de neoformação vascular é denominado de *angiogênese* (Ingram *et al*., 2005) e envolve a ativação de MMPs responsáveis pela degradação da membrana basal sub-endotelial, que é pré-requisito para a migração direta e a proliferação de células endoteliais (Bazarbachi *et al*., 2004). (Figura 4)

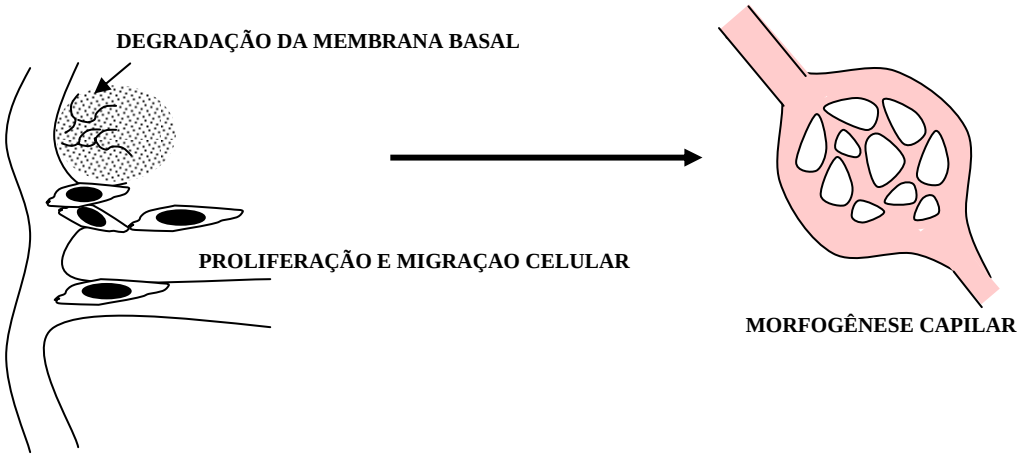


Figura 4: Angiogênese

3.8 Definição de célula endotelial e suas funções

A célula endotelial tem forma de polígono e é alongada, disposta em monocamadas envolvendo o sistema vascular formando complexos

juncionais com células vizinhas (Cotran, 2000). De estrutura maleável, no interior da árvore vascular pode adquirir espessura inferior a 0,1 µm em capilares e veias, a 1 µm na aorta (Aird, 2007a).

As células endoteliais e seus respectivos núcleos estão alinhados no sentido da direção do fluxo sanguíneo em determinados segmentos, exceto nos pontos de ramificação. O alinhamento dependente do fluxo pode modificar-se devido à capacidade de remodelação secundária ao estresse hemodinâmico. São multifuncionais, com propriedades de síntese e metabólica, destacando-se a regulação da inflamação, imunidade e crescimento celular por meio da produção de fatores estimuladores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), do fator estimulador de colônias (GM-CSF) e do FGF (Cotran, 2000). A integridade estrutural e funcional das células endoteliais é fundamental à manutenção da homeostasia da parede vascular. Mantêm interface sangue-tecido não trombogênica, modulam o fluxo sanguíneo, o metabolismo hormonal, modifica lipoproteínas durante o transporte na parede arterial, regula a permeabilidade vascular, a transmigração leucocitária, são termorreguladoras e umidificadoras, mantêm o tônus vascular, regulam a proliferação celular, a angiogênese e o crescimento de outros tipos de células (Aird, 2007a; Cotran, 2000).

Durante as décadas de 1970 e 1980, células endoteliais foram isoladas e cultivadas em cultura. A incubação de células endoteliais com mediadores inflamatórios e/ou produtos bacterianos induz atividade pró-adesiva e pró-coagulante, tornando-as *ativadas*. Estudos de

imunohistoquímica determinaram que, em diferentes leitos vasculares, estas células podem expressar diferentes proteínas (Aird, 2007b).

Do ponto de vista funcional, as células endoteliais estruturalmente intactas podem responder a vários estímulos patológicos. A *disfunção endotelial* é caracterizada por alterações potencialmente reversíveis na função das células endoteliais em resposta a um estímulo ambiental. A *estimulação endotelial* é uma resposta reversível e rápida, e independe da síntese de novas proteínas, enquanto a *ativação endotelial* depende da síntese de novas proteínas ou de alteração das pré-existentes, requerendo horas ou dias para ocorrer. Esta resposta é induzida por citocinas inflamatórias como a efetuada pela indução da molécula 1 de aderência do leucócito ao endotélio (ELAM-1), IL-1, TNF, moléculas do complexo de histocompatibilidade principal classe II (MHC II) e INTF-γ (Cotran, 2000). Com vida média de um ano, a célula endotelial permanece em estado quiescente até ser estimulada (Aird, 2007a).

3.9 Vasculogênese pós-natal

Vários pesquisadores sugerem que a MO adulta fornece células que contribuem para a vasculogênese pós-natal (Khakoo e Finkel, 2005; Prater *et al.,* 2007). Em 1963, Stump e *cols*. evidenciaram o surgimento de um novo endotélio na superfície de fluxo de um enxerto vascular bioprotético de Dacron. Não se sabia realmente se aquele endotélio representava células endoteliais maduras desprendidas da parede vascular para o sangue se realocando na parede protética, ou se CEPs estavam

repovoando o enxerto (Zammaretti e Zisch, 2005; Prater *et al*., 2007). Estudos posteriores demonstraram que na vida pós-natal humana algumas células da MO, do SP ou de cordão umbilical possuem atividade funcional de hemangioblasto e podem se diferenciar em células endoteliais. Estes dados suportam a hipótese de que existem CEPs de MO circulantes que contribuem para formar novos vasos sanguíneos no adulto via mecanismo que mimetiza a vasculogênese embrionária (Ribatti, 2004).

3.9.1 Mobilização de CEPs

Durante a vasculogênese, a mobilização de CEPs da MO para a circulação ocorre em forma de cascata (Zammaretti e Zisch, 2005). Inicialmente as CEPs dentro da MO migram para outro compartimento proliferativo conhecido como *zona vascular medular,* de onde são liberadas para a circulação. Este processo é induzido por citocinas fisiológicas e fatores de crescimento angiogênicos do SP como GM-CSF, VEGF, angiopoietina, eritropoietina e fatores derivados de células estromais da MO (Ribatti, 2004; Zammaretti e Zisch, 2005; Khakoo e Finkel, 2005; Milkiewicz *et al*. 2006; Rafat *et al.,* 2007).

No local de neovascularização, as CEPs recrutam CEPs adicionais pela liberação de fator de crescimento. Os fatores angiogênicos ativam a MMP-9 e liberam o ligante KIT solúvel (sKITL) que por sua vez, promove a proliferação e a mobilização celular no microambiente medular (Raffi *et al*., 2002; Ribatti, 2004; Ingram *et al*., 2005; Rafat *et al*., 2007).

Schneider *e cols*, relataram que os valores de CECs e de CEPs na circulação variam entre os animais. Em humanos adultos, ambas são raras na circulação representando 0,01% a 0,0001% das células mononucleares periféricas circulantes (Ingram *et al*., 2005; Khan *et al*., 2005).

A migração de células endoteliais durante a angiogênese envolve mecanismos de quimiotaxia, haptotaxia (migração direcional através de gradiente de ligantes imóveis) e mecanotaxia (migração direcional por forças mecânicas) (Lamalice *et al*., 2007). Porém, não se conhece como estes mecanismos interagem entre si e como o organismo orquestra estes eventos no intuito de promover a migração celular (Hristov e Weber, 2004; Lamalice *et al*., 2007).

3.9.2 Quantificação de CECs

Atualmente o endotélio vascular é visto como órgão dinâmico. Modelos tradicionais demonstraram que a homeostasia endotelial secundária a lesão vascular é mediada pela divisão e lateralização das células endoteliais adjacentes (Khakoo e Finkel, 2005). Entretanto existem evidências de que as CEPs desempenhem papel crítico na reendotelização de tecidos lesionados (Lamping, 2007).

Estudos em ratos e camundongos demonstraram aumento de CEPs na circulação em situações de regeneração orgânica e neovascularização tumoral como aterosclerose, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, enxerto vascular, linfoma e carcinoma pulmonar (Khakoo e Finkel, 2005; Massa *et al*., 2005; ; Kopp *et al*., 2006).

As CECs são detectadas em diversas situações de lesão endotelial, podendo apresentar-se também na forma ativada. Estão associadas a doenças e procedimentos cardíacos como periaortite crônica (Moroni *et al*., 2005), síndromes coronarianas agudas e angioplastia (Lee *et al*., 2005), anemia falciforme (Solovey *et al.,* 1997; Solovey *et al*., 1998), púrpura trombocitopênica trombótica (Lefevre *et al*, 1993), talassemia (Kyriakou *et al.,* 2001), infecção por *Rickettsia conorii* ou citomegalovírus (Mancuso *et al.,* 2001; Grefte *et al*, 1993), doença de Berçet, lupus eritematoso sistêmico, choque séptico (Mutunga *et al.,* 2001; Rafat *et al.,* 2007), diabetes mellitus (Fadini *et al*., 2007) e esclerose sistêmica (Del Papa *et al.,* 2004). Grisar *et al*. em 2005 descreveram, porém, uma diminuição de CEPs no sangue periférico de pacientes com artrite reumatóide.

Em oncohematologia, foi associada à Síndrome Mielodisplásica (Cortelezzi *et al*., 2005), Leucemia Mielóide Crônica (Korkolopoulou *et al*., 2003), Linfóide Aguda (Perez-Atayde *et al.,* 1997), Mielóide Aguda (Wierzbowska *et al*., 2005) e Mieloma Múltiplo (Zhang *et al*., 2005). Recentemente, o aumento de células endoteliais circulantes foi associado ao câncer de mama, coloretal e Linfoma não Hodgkin (Mancuso, 2001; Ribatti, 2004; Duda *et al*., 2006). A presença de CECs nestas doenças evidencia a presença de lesão vascular, porém, não há dado suficiente para correlacionar este achado com a extensão da lesão. Sabe-se que o tecido tumoral possui potencial angiogênico e seu crescimento, invasão e metástase são angiogênico-dependentes (Ribatti e Vacca, 2005). Cientistas investigaram o mecanismo de tropismo e incorporação das CEPs

na neoformação vascular em modelo tumoral usando CEPs de embriões de ratos; e demonstraram que estas células mantém a capacidade de contribuir para a angiogênese tumoral na vida adulta (Néri e Bicknell, 2005).

Surpreendentemente, durante o processo de crescimento tumoral, células endoteliais adquirem novas características e secretam citocinas contendo cistina que são quimiotáticas, e estimulam a neovascularização autócrina e endócrina (Wu *et al.,* 2005). Além disso, as CEPs derivadas da MO também contribuem para o crescimento tumoral fornecendo CEPs que se incorporam ao endotélio vascular tumoral (Khakoo e Filkel, 2005; Kopfstein e Christofori, 2006).

Assim, a detecção e a análise das CECs se tornou uma opção viável para mensurar disfunção vascular (Del Papa *et al.,* 2004). Demonstrou-se que o número absoluto de CEPs circulantes se correlaciona com o grau da atividade neoangiogênica, de forma que métodos de quantificação destas células podem ser usados como marcadores de avaliação de resposta à terapia antioangiogênica e à quimioterapia (Duda *et al*., 2006; Murasawa e Asahara, 2005; Raffi *et al*., 2002; Kopp *et al*., 2006; Aird, 2007a; Melero-Martin *et al*., 2007).

3.9.3 Caracterização fenotípica das CECs

A metodologia de quantificação de CECs por cultura celular é dispendiosa, demorada e inviável na rotina clínica . Porém, as mesmas podem ser identificadas e quantificadas pela análise de expressão de marcadores de membrana, denominados de grupos de diferenciação ou

cluster designation (CD), por citometria de fluxo como padrão ouro (Fadini *et al*., 2007). Neste método, as células são identificadas com o auxílio de anticorpos monoclonais (AcMo) conjugados à fluorocromos, determinando-se precisamente o fenótipo celular (Khan *et al*., 2005). (Figura 5)

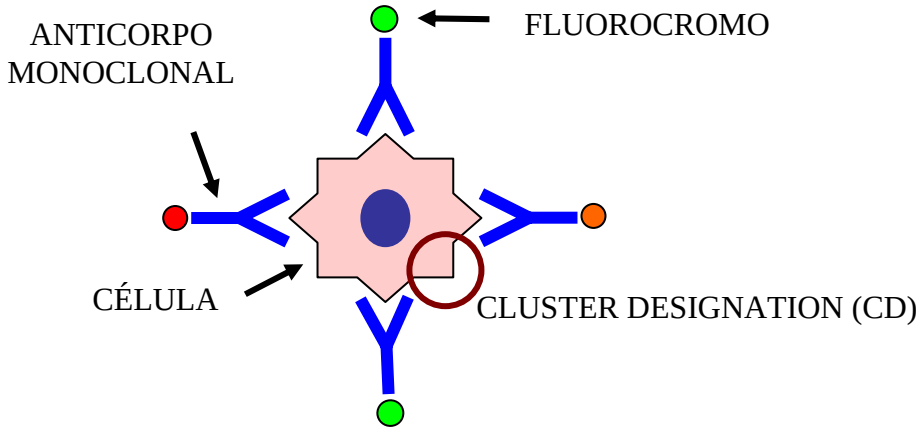


Figura 5: Descrição esquemática da identificação fenotípica celular pelo uso de anticorpos monoclonais diretamente conjugados a fluorocromos.

CECs podem ser diferenciadas da linhagem hematopoética por possuírem expressão do antígeno leucocitário comum CD45 de intensidade fraca a negativa (Wierzbowska *et al*., 2005).

O fenótipo das CEPs ainda é discutível. Células endoteliais progenitoras foram identificadas pela expressão de uma glicoproteína transmembrana de 120Kd e função desconhecida, denominada CD133. Quando CEPs são incubadas com VEGF e cultivadas em placas com colágeno e fator de crescimento insulina-símile, perdem CD133, iniciam processo de diferenciação e se transformam em CEMs (Hristov *et al.,*2003; Zamaretti e Zisch, 2005). Desta forma, a expressão de CD133 pode

diferenciar CEPs de CEMs (Yin *et al*., 1997; Zammaretti e Zisch, 2005; Khan *et al.,* 2005).

Além do marcador CD133, a célula endotelial precursora funcional expressa o marcador de célula imatura CD34 e o receptor de fator de crescimento endotelial vascular-2 (VEGFR-2/KDR) (Peichev *et al*., 2000). O antígeno CD34 porém, pode ser expresso também em células endoteliais maduras e hematopoiéticas precursoras. Desta forma, o antígeno CD34 não diferencia CEMs de CEPs efetivamente (Khan *et al*., 2005).

Um marcador de adesão de células endoteliais que foi descrito e vem sendo empregado para identificar células endoteliais circulantes, precursoras ou maduras, em vários estudos é o CD146 (também conhecido como S-endo 1, P1H12, Mel-CAM, MUC18) (Delorme *et al.,* 2005). Alguns estudos ressalvam que sua detecção pelo método da citometria de fluxo mostra positividade em alguns leucócitos como linfócitos T ativados. Seu uso deve ser avaliado em conjunto com outros marcadores (Elshal *et al*., 2005; Shaffer *et al.,* 2006). A combinação de CD45, CD3 e o CD146 pode ser utilizada para identificar e diferenciar células endoteliais dos distintos tipos celulares (Elshal *et al.,* 2005).

Outros marcadores de CECs como o CD31 (PECAM-1-molécula de adesão celular endotélio-plaquetária), CD105 (endoglina), CD106 (VCAM-1 molécula de adesão celular endotélio-vascular-1), CD141 (trombomodulina) e CD144 (VE caderina - caderina endotélio-vascular) também podem ser utilizados. As células endoteliais ativadas produzem oxido nítrico, prostaciclinas, radicais livres de oxigênio; têm atividade pró-coagulante e

elevada capacidade de adesão leucocitária e de fagocitose. Expressam a molécula de adesão CD54 (molécula de adesão intracelular-1), CD62e (E-selectina), CD106 (molécula de adesão celular-vascular1) e marcadores de atividade pró-coagulante como CD142 (fator tissular) (Khan *et al.,* 2005).

4. MÉTODOS:

4.1 Casuística:

De fevereiro de 2006 a fevereiro de 2007 foram estudados 30 indivíduos com mediana de idade de 45 anos (19 a 66 anos), 11 (36,7%) do sexo masculino e 19 (63,3%) do sexo feminino portadores do vírus HTLV1 identificados pelo teste imunoenzimático de ELISA e confirmados por Western Blot e/ou PCR soro negativos para as demais sorologias obrigatórias para doação de sangue atendidos na Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo vinculada à Universidade de São Paulo (USP) e acompanhados no ambulatório de HTLV1 do HC-FMUSP.

Deste grupo, excluíram-se três casos que durante avaliação laboratorial foram diagnosticados como ATL.

Paralelamente, foram avaliados 30 indivíduos alocados no grupo controle saudável que compareceram ao mesmo serviço para doação de plaquetas por aférese e com perfil sorológico negativo. Estes indivíduos foram pareados ao grupo de portadores do HTLV1 por idade (variação de ± 5 anos) e sexo, e tinham mediana de idade de 46 anos (20 a 63 anos). O estudo foi aprovado pela comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP. Os participantes foram selecionados aleatoriamente dentre os pacientes acompanhados no ambulatório de HTLV1, informados pessoalmente sobre a finalidade do estudo e forma de realização do mesmo, com descrição detalhada do procedimento. Os voluntários formalizaram a participação por meio de leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2 Métodos

4.2.1 Validação dos Anticorpos Monoclonais

Células endoteliais HUV-EC-C (ATCC n^{o} CRL-1730) foram cultivadas em meio 199/EBSS complementadas com 10% de Soro Fetal Bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 μg/mL de estreptomicina e mantidas em incubadora com atmosfera de 5% de CO_2, 95% de umidade e temperatura de 37°C (Figura 6).

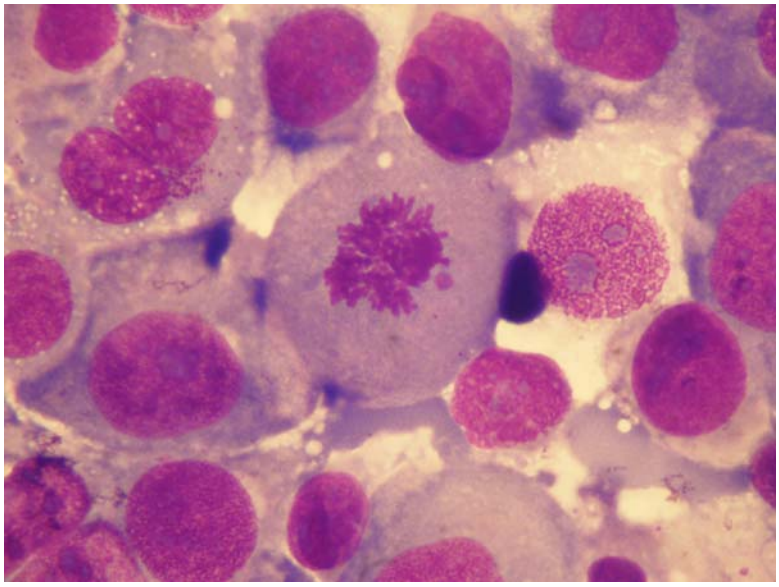


Figura 6: Lâmina preparada por citocentrifugação contendo células de linhagem endotelial humana (HUV-EC-C) coradas com Leishman e observadas em microscópio óptico (aumento de 1000X).

Após raspagem com *Cell Scrape* das células aderidas, as mesmas foram marcadas com os AcMo conjugados a seus respectivos fluorocromos como CD146 FITC, CD62e PE, CD45 PC5, CD133 APC e CD34 PE, e adquiridas em Citômetro de Fluxo FACS-Calibur (BD - Becton Dikinson, San Jose, CA). A análise foi realizada no software CellQuest Pro (BD

Immunocytometry Systems) por histograma. A análise imunofenotípica demonstrou que as células expressavam os antígenos CD133 ^{dim}, CD62e ^{bright} e CD146 ^{bright} (Figura 7).

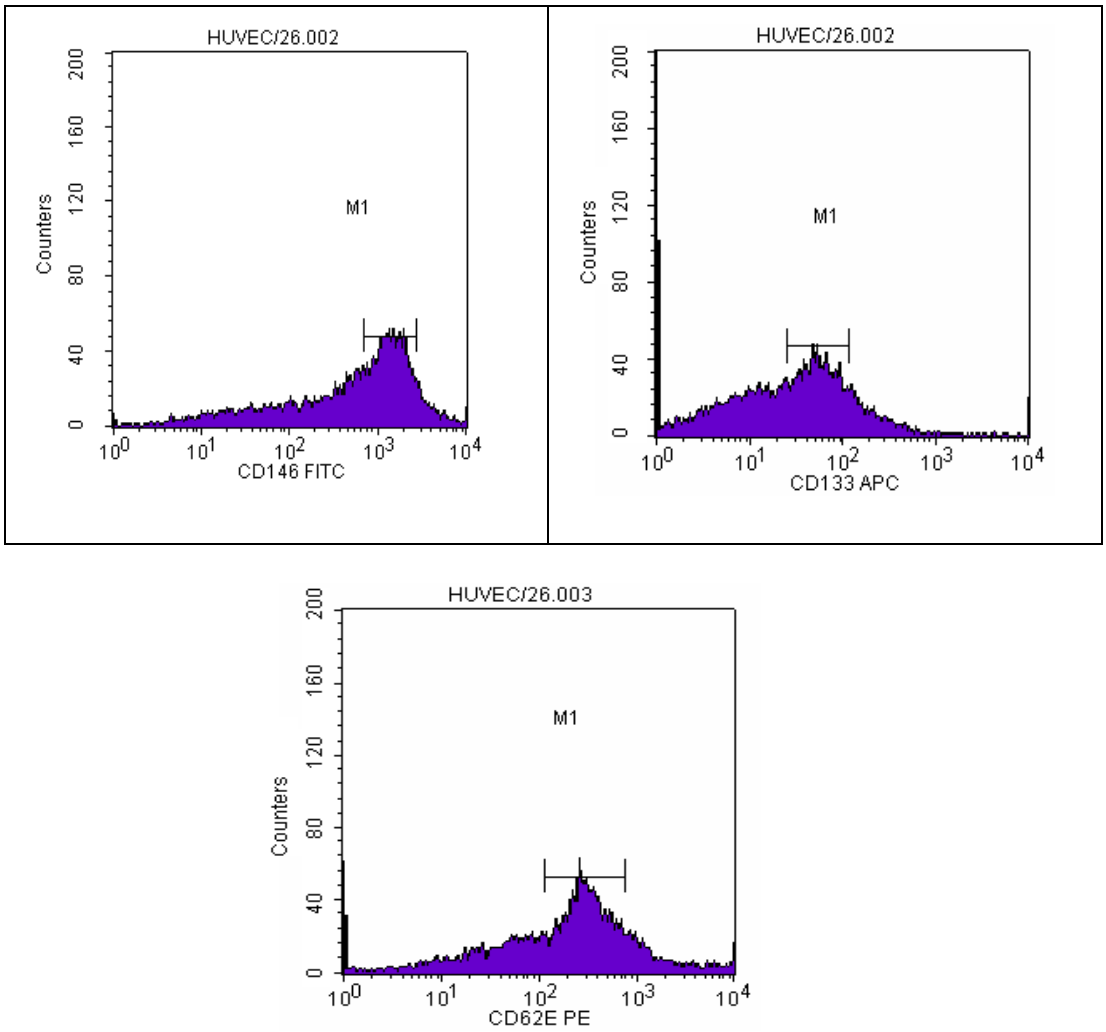


Figura 7: Histogramas evidenciando a expressão dos antígenos CD133, CD146 e CD62e em células HUV-EC-C obtidas por cultura.

4.2.2 Coleta das amostras

Foram coletados de cada participante 5ml de sangue total obtido por punção venosa periférica em tubo anticoagulado com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) durante a rotina de coleta ambulatorial. Em seguida

procedeu-se à contagem automatizada das amostras, as quais foram dispostas na estação de trabalho e mantidas à temperatura entre 18 e 25º C e processadas em no máximo quatro horas após a coleta.

4.2.3 Processamento das amostras

Para minimizar a manipulação da amostra e a conseqüente perda celular utilizamos o método de lise em sangue total. As amostras foram distribuídas em alíquotas de 1,0 ml, às quais se adicionou 3,0 ml de soro fisiológico 0,9% (SF) para posterior centrifugação à 416 x g por 3 min. Em seguida aspirou-se cuidadosamente o sobrenadante, ressuspendendo-se o centrifugado celular (*pellet)* com SF ao volume final de 1,0 ml para lavagem, com o objetivo de reduzir substâncias plasmáticas potencialmente capazes de se ligarem de forma não específica aos AcMo.

Em seguida foram colocadas $1x10^6$ células em 3 tubos previamente identificados. Ao tubo 1 adicionou-se 10µl da diluição de 1:10 de CD45 conjugado a ficoeritrina – cianina 5 (PC5) (marca Immunotech, clone J33) e os respectivos controles isotípicos. Ao tubo 2 adicionou-se 10µl do AcMo CD146 conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceina (FITC) (marca SEROTEC, clone OJ79C), 10µl de CD34 classe III conjugado a ficoeritrina (PE) (DAKO, clone BIRMA-K3), 10µl da diluição de 1:10 de CD45/PC5 e 10µl de CD133 conjugado a aloficocianina (APC) (Miltenyi Biotec, clone 293C3). Ao tubo 3 adicionou-se 10µl do AcMo CD146/FITC, 20µl de CD62e conjugado a PE (Immunostep, clone TEA2/1), 10µl da diluição de 1:10 de CD45/PC5 e 10µl de CD133/APC (Figura 8).

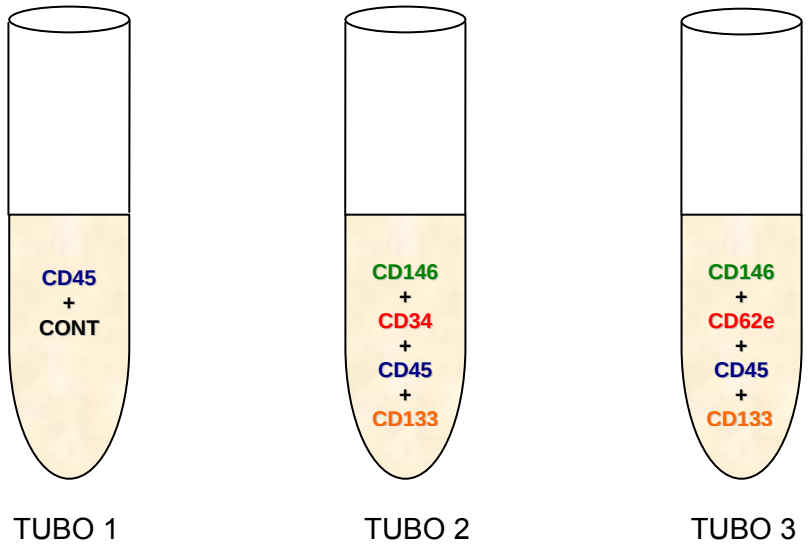


Figura 8: Modelo esquemático da disposição dos AcMo em seus respectivos tubos.

Em seguida os tubos foram incubados no escuro por 20 min e subseqüentemente procedeu-se a lise das hemácias com 2,0 ml de solução de lise (DAKO) diluída 1:10 em água destilada conforme orientações do fabricante. Em seguida os tubos foram centrifugadas 2 ½ min à 416 x g, desprezando-se o sobrenadante por inversão dos tubos e ressuspendendo-se as células em 2,0 ml de solução salina tamponada com fosfato e azida (PBS-Azida) a 0,1%. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas duas vezes por 2 ½ min à mesma velocidade para retirar o excesso de anticorpos e restos de hemácias. Ao final, as células foram ressuspensas em 400µl de paraformaldeído a 1% para leitura no citômetro de fluxo.

4.2.4 Citômetro de fluxo (CF)

Antes da aquisição das amostras o aparelho de CF foi submetido à lavagem do circuito de fluxo com água destilada / deionizada e hipoclorito de sódio a 1%, pois pequenas quantidades de fragmentos residuais de células existentes no circuito poderiam contaminar a próxima amostra a ser processada.

Posteriormente, retiraram-se bolhas de ar e obstruções que eventualmente penetram no sistema fluido do CF que podem interferir na leitura das células. Ao aspirar a amostra, o fluido isotônico do reservatório percorre todo o sistema do aparelho em forma de fluxo laminar colunar à velocidade de 10m/s. A pressão da câmara de fluxo alinha hidrodinamicamente as células para que cada uma, individualmente, entre em contato com a fonte de luz ou laser. Assim, cada célula é excitada isoladamente, emitindo fluorescência que é filtrada e captada por detectores programados para receber comprimentos de onda específicos (Figura 9).

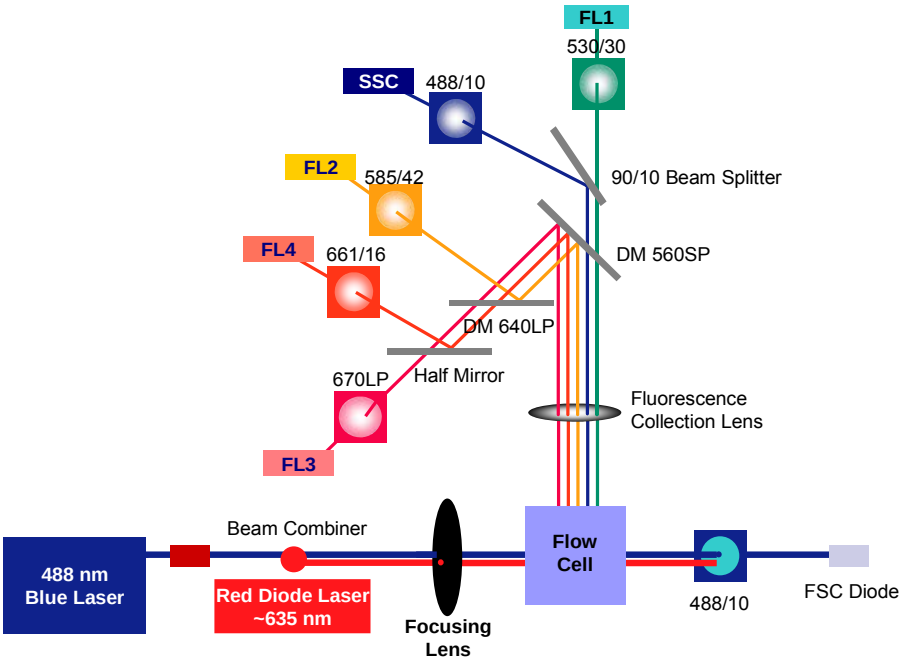


Figura 9: Sistema óptico FACSCalibur (BD)

No CF, as células são analisadas de acordo com suas propriedades físicas e químicas como tamanho e complexidade interna ou granulosidade, e intensidade média de fluorescência (IMF) proporcional ao número de ligações entre antígeno e anticorpo.

4.2.5 Compensação do aparelho e aquisição das amostras

Para monitorar o desempenho do aparelho foi utilizado o reagente CaliBRITE Beads (Becton Dickinson (B.D), San Jose, CA) adquirido no programa FACSComp (B.D, San Jose, CA), composto por pérolas não marcadas para ajustar a voltagem dos tubos fotomultiplicadores, e de pérolas marcadas para compensar as fluorescências e avaliar a sensibilidade do aparelho.

Para aquisição das amostras, um ajuste manual cuidadoso da compensação das fluorescências foi realizado com as respectivas amostras. Este procedimento foi feito para minimizar a interferência da emissão de luz captada pelos diferentes fotomultiplicadores. Para assegurar a detecção de baixos valores de células endoteliais circulantes foram adquiridos 100.000 eventos de cada tubo. Os dados foram processados utilizando o programa CellQuestPro. Estudo piloto inicial foi realizado em duplicata para garantir a reprodutibilidade do método.

Durante a aquisição, as células foram visualizadas em citograma bidimensional de dispersão frontal da luz (FSC) e dispersão lateral da luz (SSC) em escala linear, com FSC na abscissa e SSC na ordenada para identificar as populações celulares pelos parâmetros de tamanho e complexidade interna. Posteriormente, realizou-se *gate* eletrônico único em torno da população de linfócitos, monócitos e granulócitos para excluir células inviáveis da região analisada, denominada de Região1 (R1). Em um segundo citograma bidimensional, a população selecionada foi analisada em escala logarítmica com CD45/PC5 em FSC versus SSC em escala linear. Assim, foi possível delimitar novo *gate* eletrônico em torno da população celular com expressão de CD45 de fraca IMF e negativa, região das células endoteliais, a qual foi denominada de Região 2 (R2) (Figura 10).

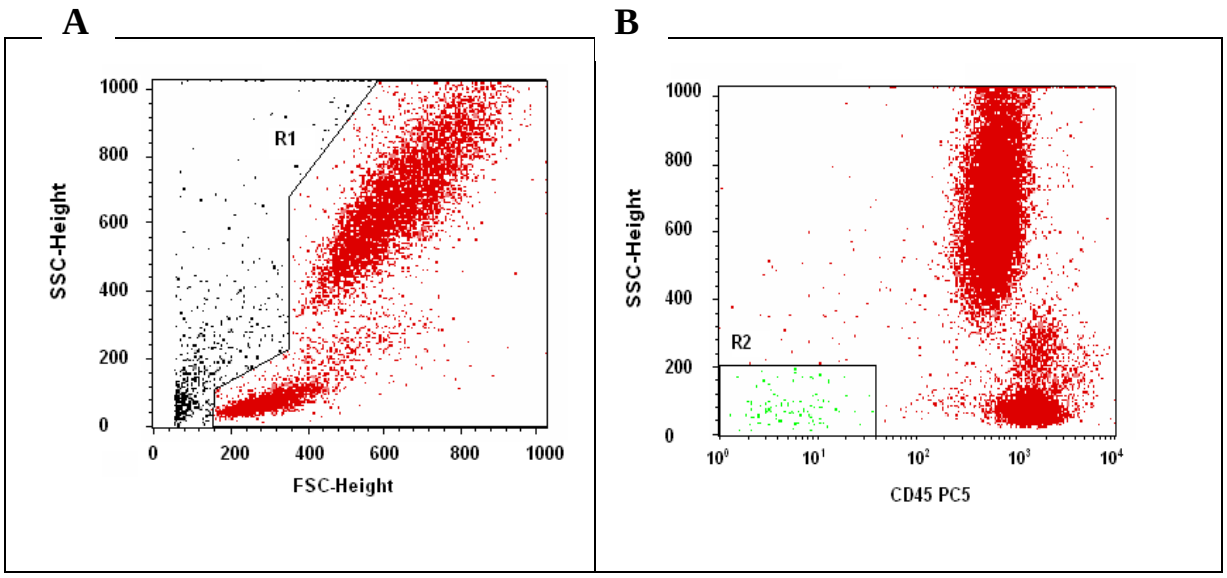


Figura 10: Citogramas bidimencionais para definição dos *gates* eletrônicos: A – Região 1, B – Região 2.

A partir de R2 foram criados quatro citogramas bidimensionais em escala logarítmca com FL1 vs FL2, FL2 vs FL4, FL1 vs FL4 na abscissa e ordenada, respectivamente, para obter a porcentagem de células expressando os antígenos CD146, CD133, CD34 e CD62e (Figura 11).

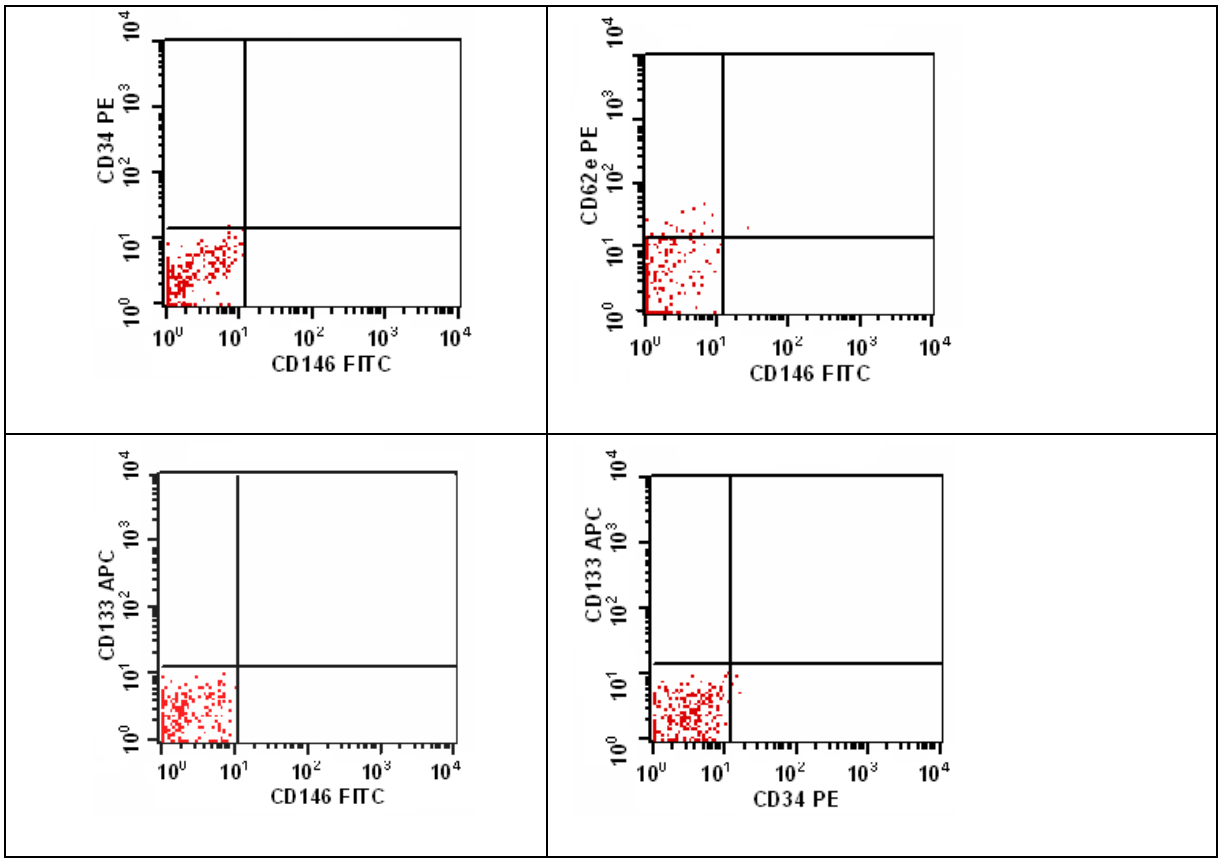


Figura 11: Citogramas bidimensionais para análise dos antígenos CD146, CD34, CD133 e CD62e.

No tubo correspondente ao controle isotípico, posicionou-se o marcador de modo a manter ≥ 99% das células de R2 dentro da negatividade, após confirmar que ≥ 99% destas células eram CD45 negativas ou fracamente positivas.

Em razão de estarmos investigando eventos raros na circulação periférica, efetuamos uma projeção dos valores de duas até o valor de quatro casas decimais por meio de uma regra de três simples entre o número de eventos de R1 e o valor encontrado nos quadrantes de interesse. Os resultados do número de células positivas para os respectivos AcMo emitidos em porcentagem foram então convertidos em valores

absolutos de células positivas por mm^3 calculada com base na leucometria total de cada paciente obtida em contador automatizado.

4.3 Análise Estatística:

Para processamento dos dados foi utilizado o programa Bioestat 4.0 (Sociedade Civil Mamirauá / MCT / Imprensa Oficial do Estado do Pará, 2005). Para verificar se as variáveis seguiam a distribuição normal, empregou-se a prova estatística de Shapiro-Wilk. Uma vez que a distribuição dos dados não podia ser aproximada pela distribuição normal calculou-se a mediana como estimadora da medida de tendência central.

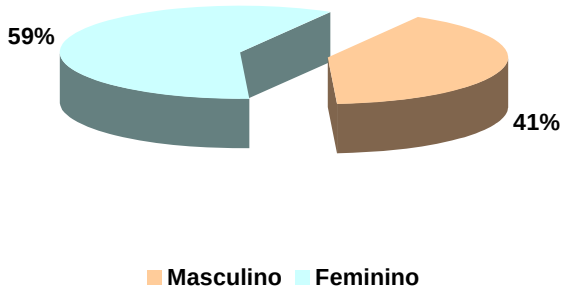
A avaliação de células endoteliais maduras e precursoras foi analisada em duplicata por ser possível identificá-las pela combinação de marcadores nos diferentes tubos para cada população do estudo. Utilizou-se o teste não paramétrico de Wilcoxon para análise entre as duplicatas dentro de cada grupo. Para análise dos valores de células endoteliais circulantes, progenitoras e maduras, e células endoteliais ativadas entre os grupos de portadores de HTLV1 e grupo controle saudável utilizou-se o teste não paramétrico de Mann Whitney. O teste foi bi-caudal com nível de significância alfa de 5%. Aceitou-se como significância estatística $p \leq 0,05$.

Para análise dos valores de células endoteliais circulantes maduras, progenitoras e ativadas entre portadores do vírus HTLV1 com baixa e elevada carga pró-viral foi utilizada a técnica de reamostragem.

5. RESULTADOS

O grupo de 27 portadores assintomáticos do HTV1 apresentou média ± desvio padrão de idade de 44 anos ± 10,2 e mediana de 45 anos (27 a 65 anos), sendo 11 (41%) do sexo masculino e 16 (59%) do sexo feminino. Os 30 participantes do grupo controle saudável apresentaram média e desvio padrão de idade de 43,3 anos ± 12,3 com mediana de 45,5 anos (20 a 63 anos) sendo 11 do sexo masculino e 19 do sexo feminino (Gráfico1).

Gráfico1: Distribuição da população portadora assintomática de HTLV1 de acordo com o sexo.



A média ± desvio padrão da leucometria em sangue periférico dos portadores assintomáticos foi de 7129,6 leucócitos / mm^3 ± 2556,4 com mediana de 6800 leucócitos / mm^3 (4000 leucócitos / mm^3 a 14400 leucócitos / mm^3), e na população controle saudável foi de 6410 leucócitos / mm^3 ± 1533,6 e mediana de 6250 leucócitos / mm^3 (4000 leucócitos / mm^3 a 10600 leucócitos / mm^3), respectivamente.

Realizou-se, inicialmente, análise das populações de CEPs e CEMs nos tubos 2 e 3 de cada população. Observou-se que a primeira e a segunda aquisição de CEPs e CEMs do grupo portador assintomático não apresentou diferença estatística entre si ($p = 0,303$ e $p = 0,300$, respectivamente), assim como não houve diferença estatística entre as

aquisições das CEPs e CEMs da população controle saudável (p = 0,567 e p = 0,331, respectivamente), documentando a reprodutibilidade do método.

A mediana de CEPs encontrada no primeiro tubo adquirido da população portadora assintomática de HTLV1 foi de 0,8288 células / mm^3 (3,3176 células / mm^3 a 0,0920 células / mm^3). A mediana de CEPs encontrada no segundo tubo do mesmo grupo foi de 0,7519 células / mm^3 (10,9368 a 0,0560 células / mm^3). A mediana de CEMs encontrada no primeiro tubo adquirido da população portadora assintomática de HTLV1 foi de 0.6380 células / mm^3 (0.0473 células / mm3 a 5.7618 células / mm^3), e a mediana de CEMs no segundo tubo da mesma população foi de 0.4418 células / mm^3 (0.0000 células / mm^3 a 9.4696 células / mm^3) (Tabela 2).

Tabela 2: Análise das aquisições em duplicata das células endoteliais progenitoras e maduras na população portadora assintomática de HTLV1.

Aquisições em duplicata das células endoteliais progenitoras no grupo portador assintomático de HTLV1 (células/mm^3)				
Aquisições	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**	***p**
primeira	0,8288	0,0920	3,3176	0.303
segunda	0,7519	0,0560	10,9368	
Aquisições em duplicata das células endoteliais maduras no grupo portador assintomático de HTLV1 (células/mm^3)				
Aquisições	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**	***p**
primeira	0,6380	0,0473	5,7618	0.300
segunda	0,4418	0,0000	9,4696	

* Teste não paramétrico pareado de Wilcoxon

Na população controle, a mediana de CEPs no primeiro tubo adquirido foi de 0,4905 células / mm^3 (0,0000 célula / mm^3 a 1,5660 células / mm^3). No segundo tubo, a mediana destas células foi de 0,5112 células / mm^3 (0,0000 célula / mm^3 a 2,7378 células / mm^3). Na mesma população, a mediana de CEMs encontrada no primeiro tubo adquirido foi de 0,4950 células / mm^3 (0,0000 célula / mm^3 a 4,0896 células / mm^3). Na segunda aquisição deste grupo, a mediana destas células foi de 0,5402 células / mm^3 (0,0000 célula / mm^3 a 2,4354 células / mm^3) (Tabela 3).

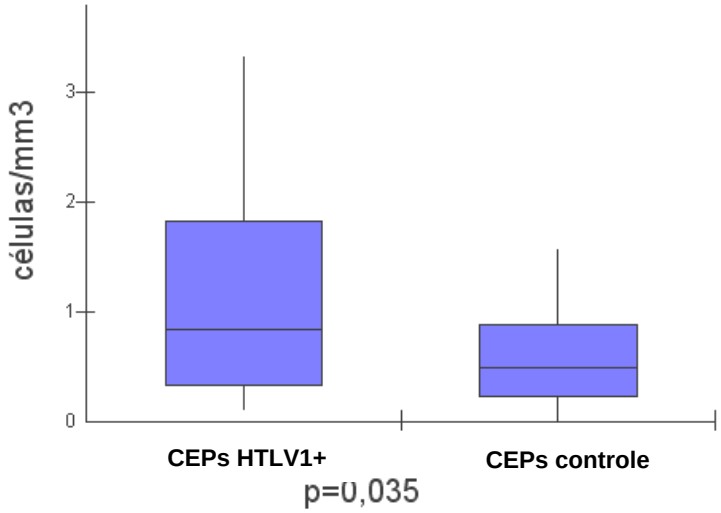
Tabela 3: Análise das aquisições em duplicata das células endoteliais progenitoras e maduras na população controle.

Aquisições em duplicata das células endoteliais progenitoras no grupo controle saudável (células/mm^3)				
Aquisições	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**	***p**
primeira	0,4905	0,0000	1,5660	0.567
segunda	0,5112	0,0000	2,7378	
Aquisições em duplicata das células endoteliais maduras no grupo controle saudável (células/mm^3)				
Aquisições	**Mediana**	**Mínimo**	**Máximo**	***p**
primeira	0,4950	0,0000	4,0896	0.331
segunda	0,5402	0,0000	2,4354	

* Teste não paramétrico pareado de Wilcoxon

Analisando os valores de CEPs encontrados na população portadora assintomática de HTLV1 em relação à população controle saudável observou-se maior número de CEPs na população portadora assintomática de HTLV1 (p=0,035) (Gráfico 2).

Gráfico 2: Análise dos valores de CEPs entre a população portadora assintomática e o grupo controle saudável.



A população portadora do vírus apresentou mediana de CEPs de 0,8288 células / mm3 (0,0920 células / mm^3 a 3,3176 células / mm^3) e a população controle saudável apresentou mediana de CEPs de 0,4905 células / mm^3 (0,0000 célula / mm^3 a 1,5660 células / mm^3) (Tabela 4).

Tabela 4: Quantificação de células endoteliais progenitoras entre a população portadora assintomática de HTLV1 e o grupo controle saudável (células/mm^3)

População	Mediana	Mínimo	Máximo	*p
CEP HTLV1+	0,8288	0,0920	3,3176	0.035
CEP controle	0,4905	0,0000	1,5660	

* teste não paramétrico para amostras independentes de Mann-Whitney

No grupo portador assintomático, a quantificação de CEMs apresentou mediana de 0,6380 células / mm3 (0,0473 células / mm^3 a 5,7618 células / mm^3), sem diferença estatística significante entre o grupo controle saudável

assintomático (p=0.697), que apresentou mediana de 0,4950 células / mm^3 (0,0000 células / mm^3 a 4,0896 células / mm^3). O total de CECs no grupo portador assintomático apresentou mediana de 1,5792 células / mm^3 (0,1840 células / mm^3 a 8,4390 células / mm^3), e no grupo controle mediana de 1,3440 células / mm^3 (valor mínimo: 0,0000 célula / mm^3 a 4,8138 células / mm^3) (Tabelas 5 e 6), sem diferença estatisticamente significante entre os grupos (p= 0.203).

Tabela 5: Quantificação de células endoteliais maduras entre a população portadora assintomática de HTLV1 e controle saudável (células/mm^3)

População	Mediana	Mínimo	Máximo	*p
CEM HTLV1+	0,6380	0,0473	5,7618	0.697
CEM controle	0,4950	0,0000	4,0896	

* teste não paramétrico para amostras independentes de Mann-Whitney

Tabela 6: Quantificação de células endoteliais circulantes entre a população portadora assintomática de HTLV1 e controle saudável (células/mm^3)

População	Mediana	Mínimo	Máximo	*p
CEC HTLV1+	1,5792	0,1840	8,4390	0.203
CEC controle	1,3440	0,0000	4,8138	

* teste não paramétrico para amostras independentes de Mann-Whitney

Entre as populações de portadores assintomáticos de HTLV1 e controle saudável também não houve diferença estatística na quantificação de células endoteliais ativadas (p=0.876). Esta população apresentou no grupo portador assintomático mediana de 0,2604 células / mm^3 (0,0000 célula / mm^3 a 2,4276 células / mm^3) e no grupo controle saudável, a

mediana foi de 0,3744 células / mm^3 (0,0000 célula / mm^3 a 0,9350 células / mm^3) (Tabela 7).

Tabela 7: Quantificação de células endoteliais ativadas entre a população portadora assintomática de HTLV1 e controle saudável (células/mm^3)

População	Mediana	Mínimo	Máximo	*p
ATIV HTLV1+	0,2604	0,0000	2,4276	0.876
ATIV controle	0,3744	0,0000	0,9350	

* teste não paramétrico para amostras independentes de Mann-Whitney

Levantou-se o valor da carga pró-viral dos indivíduos portadores assintomáticos. Entre os 27 indivíduos, apenas dois apresentavam valores acima de 100 caracterizando alta carga pró-viral. Assim, utilizou-se a técnica de reamostragem para análise estatística dos valores de células endoteliais progenitoras, maduras e ativadas encontrados nos grupos com baixa e elevada carga pró-viral. Não foi possível inferir diferença estatística entre os grupos (Tabela 8).

Tabela 8: Quantificação de células endoteliais progenitoras entre a população portadora assintomática de HTLV1 com baixa (<100 cópias/10^6 células PBMC) e elevada (>100 cópias/10^6 células PBMC) carga pró-viral (células/mm^3)

População	Mediana	Mínimo	Máximo	*p
Baixa	0,8288	0,0920	3,3176	0.305
Alta	0,8145	0,3185	1,3104	

* técnica de reamostragem.

Tabela 9: Quantificação de células endoteliais maduras entre a população portadora assintomática de HTLV1 com baixa (<100 cópias/10^6 células PBMC) e elevada (>100 cópias/10^6 células PBMC) carga pró-viral (células/mm^3)

População	Mediana	Mínimo	Máximo	*p
Baixa	0,6380	0,0473	5,7618	0.294
Alta	0,7606	0,2107	1,3104	

* técnica de reamostragem.

Tabela 10: Quantificação de células endoteliais ativadas entre a população portadora assintomática de HTLV1 com baixa (<100 cópias/10^6 células PBMC) e elevada (>100 cópias/10^6 células PBMC) carga pró-viral (células/mm^3)

População	Mediana	Mínimo	Máximo	*p
Baixa	0,2604	0,0000	2,4276	0.274
Alta	0,3664	0,1568	0,5760	

* técnica de reamostragem.

6. DISCUSSÃO

Este estudo é o primeiro realizado com o objetivo primário de quantificar células endoteliais circulantes progenitoras, maduras e ativadas em portadores assintomáticos do HTLV1 comparando com indivíduos saudáveis pareados por sexo e faixa etária.

A quantificação de CECs é reportada em estudos sobre fisiopatologia de doenças hematológicas e não-hematológicas. Demonstra-se que CECs sofrem alterações na presença de dano tecidual, ativação endotelial e potencial angiogênico. Doenças vasculares são, em parte, conseqüência da excessiva ativação endotelial em resposta ao estresse, e o estabelecimento da doença é precedido por um período caracterizado por disfunção endotelial. A mensuração desta disfunção pode ser utilizada como marcador de processo inflamatório e anormalidades endoteliais passíveis de correlação com atividade de doença (Blann *et al*, 2005; Cines *et al*, 1998; Del Papa *et al*, 2004; Kyriakou *et al*, 2001; Lee *et al*, 2005; Mancuso *et al*, 2001; Rafat *et al*, 2007; Solovey *et al*, 1997; Wierzbowska *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2005).

Poucos autores avaliaram as diferentes formas com que o endotélio contribui para a patogênese de doenças relacionadas ao HTLV1 (Blann *et al*, 2005; Murasawa e Asahara, 2005). Com base na literatura, utilizamos a análise do perfil das CECs como possível marcador biológico de ativação e mobilização celular em portadores assintomáticos do HTLV1 para validar a hipótese de que CECs possam participar de vias pró-angiogênicas neste tipo de infecção.

Células endoteliais circulantes sofrem estímulo autócrino e parácrino de fatores do crescimento. Possuem potencial endógeno de mobilização celular após a administração exógena de citocinas pró-angiogênicas, como o VEGF (Asahara *et al*, 1997; Murasawa e Asahara, 2005). Murasawa e Asahara comprovaram estes dados em estudos realizados inicialmente com camundongos e posteriormente em pacientes com isquemia miocárdica. A exemplo de outros autores, evidenciaram correlação direta entre aumento de CECs e liberação endógena de fatores estimuladores do crescimento celular após lesão vascular. Os autores concluíram que a utilização de CECs como marcador de lesão tecidual pode demonstrar que não apenas o tecido lesionado se regenera as custas de CEPs, mas que este potencial endógeno de mobilização pode estar associado à fisiopatologia tumoral e que a quantificação destas células pode ter aplicação como alvo terapêutico (Kopp *et al*, 2006; Massa *et al*, 2005; Murasawa e Asahara, 2005).

As células transformadas pelo HTLV1 são capazes de secretar altos níveis de VEGF *in vitro* e mobilizar células endoteliais a partir da medula óssea. A proteína viral Tax é a responsável pela ativação do promotor do gene do VEGF e da angiogênese. Fatores angiogênicos também potencializam a adesão entre células endoteliais e linfócitos infectados pelo HTLV1 (El-Sabban *et al*, 2002). Este resultado foi corroborado por Bazarbachi *et al* em 2004, que encontrou em amostras de pacientes com ATL níveis plasmáticos elevados de fatores pró-angiogênicos. Por outro lado, não há relato na literatura de secreção inapropriada de fatores de

crescimento por células não transformadas em portadores assintomáticos do vírus HTLV1.

Apesar da dificuldade em comparar nossos resultados com o estudo de Bazarbachi *et al* em face de não termos avaliado pacientes com ATL nem efetuado a quantificação de VEGF plasmático, encontramos maior número de células endoteliais progenitoras circulantes no sangue periférico de portadores assintomáticos do HTLV1 em comparação com a população controle ($p<0,035$).

Acreditamos que este achado sugere a existência de atividade angiogênica mesmo na ausência de transformação neoplásica, a qual pode ser explicada por efeito direto do vírus na regulação da proliferação das células endoteliais via fator de crescimento. Esta hipótese foi abstraída de estudos com citomegalovírus (CMV) em que se demonstrou que a ação viral estimula a secreção inapropriada de fatores do crescimento celular e de citocinas. O CMV é um vírus intracelular obrigatório semelhante ao HTLV1 capaz de induzir lesão vascular, modular a expressão do gene VEGF e de estimular a secreção do VEGF em pacientes com infecção aguda (Grefte *et al,* 1993*)*.

De forma semelhante, o HTLV1 pode induzir o aparecimento de doenças caracterizadas por lesão vascular como artrite, arterite, trombose, miocardite, miosite e dermatites em camundongos transgênicos portadores do gene LTR-env-pX do HTLV1. O gene viral estimula a hiperexpressão de moléculas co-estimuladoras, a exemplo do antígeno CD80/86, em células de tecido lesionado e em linfócitos T destes camundongos. Esta molécula

modula a informação do microambiente celular do linfócito T. Estes linfócitos passam a apresentar maior capacidade proliferativa, hiperreatividade contra mitógenos *in vitro*, maior expressão de moléculas de superfície relacionadas à ativação celular e tornam-se imunologicamente mais responsivos (Nakaramu *et al*, 2001). A hiperexpressão de CD80/86 ocorre em linfócitos teciduais e circulantes (Nakaramu, 1997). Como neste modelo experimental, o HTLV1 pode causar outras doenças além da ATL e HAM/TSP em seres humanos, caracterizadas por intensa lesão tecidual como uveíte, dermatite, polimiosite, artrite, pneumonite, carcinoma de pequenas células pulmonar e Síndrome de Sjogren (Magrath, 1997).

A principal característica da ATL é a elevada capacidade de invasão cutânea e visceral por células leucêmicas (Nicot, 2005). Os linfócitos transformados possuem capacidade adesiva endotelial superior à dos linfócitos não transformados e desenvolvem junções comunicantes com as células endoteliais (Mori *et al*, 2002; Murasawa e Asahara, 2004). Este dado corrobora com os achados de Bazarbachi *et al* de que o potencial invasivo dos linfócitos transformados depende do potencial de adesão destes linfócitos com o endotélio (Bazarbachi *et al*, 2004). Em resposta à maior adesividade das células transformadas induzida pela proteína viral Tax, o endotélio se modifica e se torna capaz de secretar metaloproteinases que permitem a passagem da célula maligna através da membrana basal em direção ao tecido (Al-Fahim *et al*, 1999; Bazarbachi *et al*, 2004; El-Sabban *et al*, 2002; Mori *et al*, 2002). Este processo é

importante em doentes com HAM/TSP ao facilitar a passagem dos linfócitos infectados pela barreira hematoencefálica (Al-Fahim *et al*, 1999).

A pesquisa de marcadores moleculares também é alvo dos estudos que investigam o processo pelo qual as células leucêmicas da ATL invadem os tecidos. A hiperexpressão da molécula de adesão celular originalmente identificada como supressor do crescimento de células tumorais pulmonares (TSLC1) nas células leucêmicas da ATL, sugere sua correlação com a capacidade de invasão tecidual da ATL principalmente em sua forma aguda (Sasaki *et al,* 2005).

Um fator que parece estimulante ao desenvolvimento da ATL é a carga pró-viral individual. O risco é maior em portadores com elevada carga pró-viral do HTLV1, porém os fatores iniciadores de doença não estão bem estabelecidos (Vine *et al*, 2004). Kchour *et al* determinaram que o nível plasmático de VEGF e a carga pró-viral são proporcionalmente maiores em pacientes com ATL do que em portadores assintomáticos. Demonstraram que o tratamento com Zidovudina associado ao α-interferon reduz a carga pró-viral e os níveis de VEGF, o que aumenta a sobrevida dos pacientes sugerindo que esta terapia possua efeito antiangiogênico (Kchour *et al*, 2007). Neste estudo tentamos subdividir os portadores assintomáticos em grupos com elevada e baixa carga pró-viral correlacionando-os com os valores de CECs, porém não evidenciamos resultados estatisticamente significantes o que pode ter ocorrido devido à pequena amostragem.

Murasawa e Asahara referem que os valores de CECs estão sujeitos a interferência da idade e doenças associadas (Murasawa e Asahara 2005). Alguns autores vão de encontro a este dado e não suportam esta hipótese (Shaffer *et al*, 2006). Devido à ausência de consenso em relação aos valores de referência, pareamos cada portador do vírus com um doador saudável do mesmo sexo e faixa etária.

Em nosso estudo não estabelecemos valores de referência (*cutoff point*) para as diferentes formas de CECs em sangue periférico. Assim como na literatura, correlacionamos os valores encontrados com os valores de CECs obtidos em amostras de indivíduos saudáveis (Murasawa e Asahara, 2005; Solovey *et al*, 1997). Os estudos mostram que os valores de CECs em indivíduos saudáveis, apesar de detectados através de diferentes metodologias, variaram de 0,7 $\pm$ 0,3 células/ml (Mutunga *et al*, 2001) a 77 células/ml (Del Papa *et al*, 2004). Em nosso grupo controle a mediana de CECs foi de 1,3440 células/mm^3 (variando de 0,0000 células/mm^3 a 4,8138 células/mm^3), e no grupo de portadores do HTLV1 a mediana de CECs foi de 1,5792 células/mm^3 (variando de 0,0000 células/mm^3 a 8,4390 células/mm^3), o que não foi estatisticamente significante em comparação ao grupo controle saudável. O quantitativo de CECs encontrado nas amostras de sangue periférico utilizadas em nosso estudo permanece de baixa freqüência, em consonância com outros estudos da literatura.

Em nosso estudo, identificamos as CECs e suas sub populações através da citometria de fluxo com a aplicação da análise multiparamétrica

à semelhança de outros estudos (Kyriakou *et al*, 2001; Mancuso *et al*, 2001; Wierzbowska *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2005; Del Papa *et al*, 2004; Rafat *et al*, 2007; Massa *et al*, 2005). Com o auxílio de marcadores de superfície celular identificamos as células endoteliais maduras, progenitoras e ativadas circulantes. Não detectamos diferença estatística significativa entre o número de CEMs e ativadas entre portadores assintomáticos do HTLV1 e indivíduos saudáveis. Alguns autores demonstraram que pacientes com câncer possuem maior número de CEPs, CEMs e células endoteliais ativadas circulantes (Khan *et al*, 2005; Mancuso *et al*, 2001; Wierzbowska *et al*, 2005). Seria importante quantificar o número de células endoteliais circulantes em portadores de ATL.

A citometria de fluxo é a metodologia preferencial para identificar e quantificar CECs (Khan *et al*, 2005). A separação destas células com micropartículas (*beads*) magnéticas marcados com anti-CD146 raramente gera resultados com elevada pureza. Desta forma, um número significante de linfócitos T e monócitos pode contaminar as amostras de sangue periférico. Para evitar esta contaminação, alguns autores utilizam um segundo método, usualmente microscopia de fluorescência, para confirmar que todas as células separadas são da linhagem endotelial (Khan *et al*, 2005). Também encontramos forte intensidade de expressão de CD146 na população de células de pequeno tamanho e baixa complexidade, condizente com a projeção de linfócitos.

Adotamos o antígeno CD146 como marcador de célula endotelial progenitora e madura de acordo com Mancuso *et al*. que quantificou CECs

em sangue de pacientes de pacientes com linfoma e câncer de mama (Mancuso *et al*, 2001). Grande parte dos autores que desenvolvem estudos utilizando a citometria de fluxo utiliza o antígeno CD146 como marcador específico da linhagem endotelial, porém não existe consenso em relação ao marcador ideal para definir esta linhagem (Khan *et al*, 2005; Ribatti, 2004; Wierzbowska *et al,* 2005; Zhang *et al,* 2005; Mancuso *et al*, 2001). Em contrapartida, Duda *et al* avaliaram o sangue periférico de pacientes com câncer de reto e não encontraram expressão de CD146 em células endoteliais progenitoras do endotélio vascular sugerindo que em tumores dependendo da agressividade ou do tipo de tumor, as CECs podem diferir entre si quanto ao fenótipo de superfície (Duda *et al*, 2006).

Em nosso estudo, utilizamos o antígeno CD133 para identificar CEPs em detrimento ao marcador CD34 como marcador de imaturidade conforme a maior parte dos autores, visto que o CD34 não é um marcador exclusivo da linhagem endotelial (Iwami *et al*, 2004; Zammaretti e Zisch, 2005). Em concordância com este dado, encontramos pequena porcentagem de células CD34+/CD133-. O marcador de ativação endotelial CD62e foi testado e validado em células HUV-EC-C cultivadas *in vitro,* assim como os demais marcadores utilizados em nossa pesquisa.

A detecção com elevada pureza de evento extremamente raro é o maior fator limitante dos estudos envolvendo quantificação de células endoteliais circulantes; o que requer metodologia com exígua quantidade de fatores de interferência (Khan *et al*, 2005). Em nosso estudo o principal fator de interferência observado em algumas amostras foi a ineficiência do

processo de lise de hemácias, o que gerou ligação antigênica inespecífica e levou ao descarte destas amostras por comprometimento da análise.

Algumas manobras como a utilização de marcadores de viabilidade celular e delimitadores (*gates*) eletrônicos podem minimizar a interferência de células mortas e outros grupos celulares que possam alterar os resultados e superestimar os valores reais de CECs (Khan *et al*, 2005). Assim como alguns autores adotamos a estratégia de *gate* sobre *gate* para excluir os fatores de interferência acima descritos, com boa reprodutibilidade e fácil aplicabilidade.

A definição de que CECs têm pequeno tamanho, baixa complexidade e fraca expressão do CD45 foi usada de forma complementar para refinar a estratégica de *gate* visando excluir outros tipos celulares (Mancuso *et al*, 2001). Porém vale ressaltar que Strijbos *et al* encontraram plaquetas nesta localização (Strijbos *et al,* 2007).

Ambos os receptores VEGFR1 e 2 são expressos em todas as células endoteliais vasculares de adultos, com exceção das cerebrais. O VEGFR1 está expresso também em células primordiais hematopoiéticas, monócitos, células trofoblásticas, células de coriocarcinoma, renais mesangiais, vasculares de músculo liso, mieloma múltiplo e células leucêmicas. O VEGFR 2 é expresso ainda em CEPs, células do duto pancreático, células progenitoras da retina e em magacariócitos. Ambos apresentam expressão elevada em câncer de rim, bexiga, ovário e cérebro. Alguns estudos preferem utilizar o marcador VEGFR2 para identificar CEPs e levantam a

possibilidade de aplicá-lo como possível alvo terapêutico (Podar e Anderson, 2005).

O papel funcional do VEGFR1 é complexo e depende do tipo e estágio de diferenciação celular. A sinalização mediada pelo VEGFR1 induz a produção de MMP9 em células endoteliais pulmonares e facilita o desenvolvimento de metástases neste local. O bloqueio do VEGFR1 pode atenuar a formação vascular em alguns tumores, na retinopatia isquêmica e na artrite reumatóide; além de bloquear o processo inflamatório propriamente dito. Entretanto, o papel tanto do VEGF quanto do VEGFR1 no mieloma múltiplo e nas leucemias necessita ser mais bem estudado (Podar e Anderson, 2005).

O VEGFR2, apesar de intermediar o desenvolvimento da angiogênese e da hematopoiese ao estimular a proliferação, migração, diferenciação e a sobrevida da célula endotelial; além de induzir a permeabilidade vascular e a formação de ilhotas sanguíneas, ao ser bloqueado não inibe a formação vascular nas situações aplicadas ao VEGFR1 (Podar e Anderson, 2005). Este dado nos faz acreditar que sejam necessários mais estudos para viabilizar sua aplicação como possível alvo terapêutico.

Durante esta pesquisa percebemos que apesar dos avanços científicos alcançados na área das vias angiogênicas patológicas, poucos autores se detêm ao estudo das doenças associadas ao HTLV1. A elevada prevalência do HTLV1, longo período de latência, elevado poder de infectividade e terapêutica específica ineficaz torna imprescindível a necessidade exaustiva da procura por novas modalidades de tratamento.

É preciso investir na prevenção da transmissão do HTLV1 e em terapias de resgate para portadores assintomáticos além de implementar a terapêutica das doenças associadas ao vírus. Conhecemos pouco da biologia da ATL mas, assim como Kchour *et al* em 2008 que avaliou a densidade microvascular em órgãos comprometidos de 20 casos de ATL comparando com órgãos de pessoas saudáveis e demonstrou significativo aumento da densidade microvascular na ATL (Kchour *et al*, 2008), acreditamos que a angiogênese é de fato uma via importante na fisiopatologia da doença. Nosso achado sugere que mesmo portadores assintomáticos sofrem estímulo viral pró-angiogênico durante todo o período da infecção. Seria interessante correlacionar nossos achados com os níveis plasmáticos de VEGF desta população para entender melhor este mecanismo.

Para estudo e aplicação da quantificação de células endoteliais circulantes como marcador biológico de atividade angiogênica em portadores de ATL, seria necessária a idealização de um estudo multicêntrico com intuito de reunir um número satisfatório de indivíduos afetados. Diante disto, a identificação de marcadores biológicos com interesse terapêutico e o entendimento de como, quando ou o quê induz esta transformação leucêmica parece em alguns momentos algo distante. Alguns erros de análise científica poderiam desestimular este iniciativa, como subestimar o potencial de transformação neoplásica do vírus ao levar em conta que apenas 5% dos portadores evoluirão para ATL. É preciso ter em mente que a mortalidade na ATL pode chegar a 90% em 4 anos.

A realidade é que todo dia aprendemos que o diagnóstico precoce é uma ferramenta insubstituível na luta contra o câncer. É necessário adotar esta meta. Adquirimos a consciência de que, persistir na investigação de alvos biológicos factíveis de serem utilizados para monitorar e dar subsídio para que novas estratégias terapêuticas sejam aplicadas em doenças ainda incuráveis, como a ATL, faz a intenção de qualquer pesquisa científica da área plenamente justificável.

7. CONCLUSÕES

- Células endoteliais progenitoras circulantes são encontradas em maior quantidade no sangue periférico de portadores assintomáticos do HTLV1 em comparação com indivíduos saudáveis.
- A quantidade de células endoteliais maduras e ativadas circulantes no sangue periférico de portadores assintomáticos do HTLV1 não tem diferença estatísticamente significativa do valor encontrado em indivíduos saudáveis.
- A pequena quantidade de portadores assintomáticos do HTLV1 com elevada carga pró-viral prejudicou a análise da relação entre carga pró-viral e valor de células endoteliais progenitoras circulantes no sangue periférico desta população.
- A quantificação de células endoteliais circulantes por citometria de fluxo é um ensaio factível de ser realizado na rotina laboratorial, porém deve ser cuidadosamente executado para evitar resultados superestimados.
- Células endoteliais circulantes progenitoras, maduras e ativadas, são raras no sangue periférico de indivíduos saudáveis.

8. ANEXOS

ANEXO A

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.NOME DO PACIENTE.....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M □ F □
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO.....Nº.....APTO: .....
BAIRRO.....CIDADE.....
CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

2.RESPONSÁVEL LEGAL.....
NATUREZA(grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M □ F □
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:.....
BAIRRO.....CIDADE:.....
CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **"QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS CIRCULANTES EM PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DO VIRUS LINFOTROPICO HUMANO DE CÉLULAS T DO TIPO 1 (HTLV1) POR CITOMETRIA DE FLUXO "**

2. PESQUISADOR:.Dra.AnaLuísaLangankePedroso

CARGO/FUNÇÃO: Médica Hematologista INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 105.607

UNIDADE DO HCFMUSP:Laboratório de Imunopatologia

5. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO □ RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO □

RISCO BAIXO RISCO MAIOR □

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como □eixa□üência imediata ou tardia do estudo)

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. justificativa e os objetivos da pesquisa:

O vírus HTLV1 foi descoberto em 1980 nos Estados Unidos e hoje se sabe que ele é encontrado em todo o mundo. A maioria das pessoas que tem esta infecção não sente nada, mas algumas podem desenvolver alterações nervosas como paralisia das pernas, problemas na visão e um tipo de câncer no sangue. Não se sabe como, nem por quê, somente algumas pessoas vão ter alguma destas doenças e várias pesquisas estão sendo feitas para descobrir como isto acontece. Gostaríamos de convidar você a participar de uma destas pesquisas como voluntário. Neste estudo, vamos contar no sangue do paciente infectado um tipo de célula que normalmente é bem rara. Acreditamos que elas podem aumentar em quantidade nas pessoas que vão ter alguma doença causada pelo vírus no futuro; estaremos tentando prever se esta pessoa vai adoecer, facilitando o acompanhamento e controle da doença.

2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais:

Caso você concorde em participar, durante uma de suas consultas de rotina no Ambulatório de HTLV1, você já poderá colher 10 ml de sangue de uma única vez (2 tubinhos de tampa roxa) que será feito por um profissional experiente. Isto é feito da mesma forma que se colhe o exame de sangue para a sua consulta. O material será estudado no Laboratório de Imunopatologia do Hospital das Clínicas / FMUSP em um aparelho chamado Citômetro de Fluxo que consegue identificar e contar a célula que vamos estudar; os resultados serão guardados no computador e analisados sem sabermos de que paciente se trata.

3. desconfortos e riscos esperados:

Este estudo tem risco mínimo para as pessoas que participarem. O único desconforto é a coleta de sangue. Isto não levará a nenhum problema como diminuição importante da quantidade do sangue ou anemia.

5. benefícios que poderão ser obtidos:

Você estará ajudando a entender melhor como as pessoas infectadas com o vírus HTLV1 se comportam, tentando descobrir se há como identificar através do sangue, células que poderiam estar aumentadas nestas pessoas. Com isso, talvez prever quando um paciente vai desenvolver alguma doença relacionada com o vírus.

ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

Qualquer dúvida pode ser respondida por uma das médicas responsáveis pela pesquisa (Dra. Ana Luísa e Dra. Juliana) no laboratório de Imunopatologia, localizado no 1º andar do Prédio dos Ambulatórios do Hospital das Clínicas, situado à Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, n. 155 – Cerqueira César – São Paulo. Telefone para contato: (11) – 3061-5544, de segunda à sexta-feira no horário comercial.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.

Sua participação é voluntária, podendo recusar sem que isso leve nenhum prejuízo a você. Caso você concorde em participar, você pode deixá-lo a qualquer momento.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

Todos os dados adquiridos serão absolutamente confidenciais e serão usados somente com fins científicos. Nenhum paciente terá sua identidade divulgada ou revelada.

4. disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

Caso aconteça alguma coisa durante a coleta do sangue para a pesquisa, o funcionário estará orientado a comunicar os médicos responsáveis e qualquer assistência será prestada no próprio HC.

5. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

Não haverá danos a sua saúde por que não será necessário entrar em contato direto com o paciente, exceto durante a coleta do material para análise.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Laboratório de Imunopatologia, 1º andar do Prédio dos Ambulatórios do Hospital das Clínicas. Telefone para contato: (11) – 3061-5544. Falar com Dra. Ana Luísa ou Dra. Juliana

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, de de 20 .

_____ _____

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinaturado pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO B

VALORES DE CEPs ENCONTRADOS NA POPULAÇÃO PORTADORA ASSINTOMÁTICA DE HTLV1 (PORCENTAGEM E CÉLULAS/ mm^3)

N.	CEP1 %	CEP1/mm^3	CEP2 %	CEP2/mm^3
1	0,0158	**0,8848**	0,0264	**1,4784**
2	0,0078	**0,3744**	0,0078	**0,3744**
3	0,0263	**1,7358**	0,0153	**1,0098**
4	0,0105	**0,7350**	0,0042	**0,2940**
5	0,0029	**0,1160**	0,0014	**0,0560**
6	0,0053	**0,2968**	0,0032	**0,1792**
7	0,0276	**2,6772**	0,0106	**1,0282**
8	0,0140	**0,9520**	0,0173	**1,1764**
9	0,0010	**0,0920**	0,0062	**0,5704**
10	0,0298	**1,9072**	0,0386	**2,4704**
11	0,0268	**2,2512**	0,1302	**10,9368**
12	0,0051	**0,3519**	0,0072	**0,4968**
13	0,0105	**0,4935**	0,0115	**0,5405**
14	0,0221	**1,2155**	0,0750	**4,1250**
15	0,0031	**0,2914**	0,0094	**0,8836**
16	0,0065	**0,3185**	0,0065	**0,3185**
17	0,0020	**0,1460**	0,0103	**0,7519**
18	0,0091	**1,3104**	0,0071	**1,0224**
19	0,0176	**2,1824**	0,0155	**1,9220**
20	0,0198	**0,8316**	0,0125	**0,5250**
21	0,0112	**0,8288**	0,0040	**0,2960**
22	0,0300	**2,5200**	0,0486	**4,0824**
23	0,0271	**2,4119**	0,0083	**0,7387**

N.	CEP1 %	CEP1/mm^3	CEP2 %	CEP2/mm^3
24	0,0138	**0,6624**	0,0138	**0,6624**
25	0,0166	**0,7138**	0,0130	**0,5590**
26	0,0031	**0,3007**	0,0136	**1,3192**
27	0,0638	**3,3176**	0,1094	**5,6888**

ANEXO C

VALORES DE CEPs ENCONTRADOS NA POPULAÇÃO CONTROLE SAUDÁVEL (PORCENTAGEM E CÉLULAS/ mm^3)

N,	CEP1%	CEP1/mm^3	CEP2%	CEP2/mm^3
1	0,0114	**0,9234**	0,0051	**0,4131**
2	0,0020	**0,1980**	0,0010	**0,0990**
3	0,0093	**0,6510**	0,0083	**0,5810**
4	0,0022	**0,1584**	0,0033	**0,2376**
5	0,0068	**0,3808**	0,0114	**0,6384**
6	0,0031	**0,2170**	0,0041	**0,2870**
7	0,0061	**0,3233**	0,0092	**0,4876**
8	0,0148	**0,9472**	0,0106	**0,6784**
9	0,0043	**0,2580**	0,0075	**0,4500**
10	0,0101	**0,5454**	0,0507	**2,7378**
11	0,0102	**0,7242**	0,0072	**0,5112**
12	0,0010	**0,0740**	0,0010	**0,0740**
13	0,0044	**0,2640**	0,0121	**0,7260**
14	0,0053	**0,4240**	0,0074	**0,5920**
15	0,0033	**0,2376**	0,0011	**0,0792**
16	0,0109	**0,4905**	0,0000	**0,0000**
17	0,0000	**0,0000**	0,0000	**0,0000**
18	0,0000	**0,0000**	0,0015	**0,1050**
19	0,0115	**0,8280**	0,0031	**0,2232**
20	0,0041	**0,1845**	0,0041	**0,1845**
21	0,0261	**1,5660**	0,0166	**0,9960**
22	0,0121	**0,8712**	0,0309	**2,2248**
23	0,0105	**0,5775**	0,0095	**0,5225**
24	0,0277	**1,2465**	0,0349	**1,5705**

N,	CEP1%	CEP1/mm^3	CEP2%	CEP2/mm^3
25	0,0176	**0,8800**	0,0431	**2,1550**
26	0,0102	**1,0812**	0,0144	**1,5264**
27	0,0192	**1,1520**	0,0160	**0,9600**
28	0,0088	**0,3696**	0,0033	**0,1386**
29	0,0175	**1,1025**	0,0082	**0,5166**
30	0,0041	**0,1640**	0,0020	**0,0800**

ANEXO D

VALORES DE CEMs ENCONTRADOS NA POPULAÇÃO PORTADORA ASSINTOMÁTICA DE HTLV1

(PORCENTAGEM E CÉLULAS/ mm^3)

N,	CEM1 %	CEM1/mm^3	CEM 2 %	CEM 2/mm^3
1	0,0127	**0,7112**	0,0116	**0,6496**
2	0,0022	**0,1056**	0,0022	**0,1056**
3	0,0855	**5,6430**	0,0263	**1,7358**
4	0,0168	**1,1760**	0,0042	**0,2940**
5	0,0101	**0,4040**	0,0072	**0,2880**
6	0,0182	**1,0192**	0,0074	**0,4144**
7	0,0594	**5,7618**	0,0180	**1,7460**
8	0,0205	**1,3940**	0,0129	**0,8772**
9	0,0010	**0,0920**	0,0000	**0,0000**
10	0,0010	**0,0640**	0,0165	**1,0560**
11	0,0175	**1,4700**	0,0000	**0,0000**
12	0,0051	**0,3519**	0,0020	**0,1380**
13	0,0042	**0,1974**	0,0094	**0,4418**
14	0,0116	**0,6380**	0,0169	**0,9295**
15	0,0041	**0,3854**	0,0052	**0,4888**
16	0,0043	**0,2107**	0,0153	**0,7497**
17	0,0166	**1,2118**	0,0093	**0,6789**
18	0,0091	**1,3104**	0,0020	**0,2880**
19	0,0062	**0,7688**	0,0103	**1,2772**
20	0,0062	**0,2604**	0,0114	**0,4788**
21	0,0061	**0,4514**	0,0010	**0,0740**
22	0,0124	**1,0416**	0,0403	**3,3852**

N,	CEM 1 %	CEM1/mm^3	CEM2 %	CEM2/mm^3
23	0,0480	**4,2720**	0,1064	**9,4696**
24	0,0191	**0,9168**	0,0053	**0,2544**
25	0,0011	**0,0473**	0,0011	**0,0473**
26	0,0010	**0,0970**	0,0000	**0,0000**
27	0,0045	**0,2340**	0,0022	**0,1144**

ANEXO E

VALORES DE CEMs ENCONTRADOS NA POPULAÇÃO CONTROLE SAUDÁVEL (PORCENTAGEM E CÉLULAS/ mm^3)

N,	CEM1 %	CEM1/mm^3	CEM2 %	CEM2/mm^3
1	0,0031	**0,2511**	0,0031	**0,2511**
2	0,0071	**0,7029**	0,0246	**2,4354**
3	0,0322	**2,2540**	0,0291	**2,0370**
4	0,0011	**0,0792**	0,0010	**0,0720**
5	0,0274	**1,5344**	0,0205	**1,1480**
6	0,0020	**0,1400**	0,0020	**0,1400**
7	0,0113	**0,5989**	0,0257	**1,3621**
8	0,0074	**0,4736**	0,0021	**0,1344**
9	0,0021	**0,1260**	0,0032	**0,1920**
10	0,0253	**1,3662**	0,0203	**1,0962**
11	0,0576	**4,0896**	0,0308	**2,1868**
12	0,0105	**0,7770**	0,0073	**0,5402**
13	0,0044	**0,2640**	0,0022	**0,1320**
14	0,0116	**0,9280**	0,0201	**1,6080**
15	0,0299	**2,1528**	0,0088	**0,6336**
16	0,0043	**0,1935**	0,0054	**0,2430**
17	0,0000	**0,0000**	0,0000	**0,0000**
18	0,0030	**0,2100**	0,0045	**0,3150**
19	0,0199	**1,4328**	0,0084	**0,6048**
20	0,0051	**0,2295**	0,0020	**0,0900**
21	0,0035	**0,2100**	0,0083	**0,4980**
22	0,0165	**1,1880**	0,0143	**1,0296**
23	0,0137	**0,7535**	0,0116	**0,6380**

N,	CEM1 %	CEM1/mm^3	CEM2 %	CEM2/mm^3
24	0,0123	**0,5535**	0,0195	**0,8775**
25	0,0099	**0,4950**	0,0121	**0,6050**
26	0,0030	**0,3180**	0,0020	**0,2120**
27	0,0032	**0,1920**	0,0053	**0,3180**
28	0,0066	**0,2772**	0,0055	**0,2310**
29	0,0217	**1,3671**	0,0248	**1,5624**
30	0,0062	**0,2480**	0,0083	**0,3320**

ANEXO F

VALORES DE CECs E CÉLULAS ENDOTELIAIS ATIVADAS ENCONTRADOS NA POPULAÇÃO PORTADORA ASSINTOMÁTICA DE HTLV1 (PORCENTAGEM E CÉLULAS/ mm^3)

N,	CEC/mm^3	ATIVADA%	ATIVADA/mm^3
1	**0,9692**	0,0042	**0,2352**
2	**0,4800**	0,0055	**0,2640**
3	**7,3788**	0,0109	**0,7194**
4	**1,9110**	0,0021	**0,1470**
5	**0,5200**	0,0014	**0,0560**
6	**1,3160**	0,0042	**0,2352**
7	**8,4390**	0,0106	**1,0282**
8	**2,3460**	0,0064	**0,4352**
9	**0,1840**	0,0000	**0,0000**
10	**1,9712**	0,0165	**1,0560**
11	**3,7212**	0,0000	**0,0000**
12	**0,7038**	0,0030	**0,2070**
13	**0,6909**	0,0147	**0,6909**
14	**1,8535**	0,0116	**0,6380**
15	**0,6768**	0,0010	**0,0940**
16	**0,5292**	0,0032	**0,1568**
17	**1,3578**	0,0031	**0,2263**
18	**2,6208**	0,0040	**0,5760**
19	**2,9512**	0,0093	**1,1532**
20	**1,0920**	0,0062	**0,2604**
21	**1,2802**	0,0010	**0,0740**
22	**3,5616**	0,0289	**2,4276**

N,	CEC/mm^3	ATIVADA%	ATIVADA/mm^3
23	**6,6839**	0,0187	**1,6643**
24	**1,5792**	0,0138	**0,6624**
25	**0,7611**	0,0011	**0,0473**
26	**0,3977**	0,0010	**0,0970**
27	**3,5516**	0,0057	**0,2964**

ANEXO G

VALORES DE CECs E CÉLULAS ENDOTELIAIS ATIVADAS ENCONTRADOS NA POPULAÇÃO CONTROLE SAUDÁVEL (PORCENTAGEM E CÉLULAS/ mm^3)

N,	CEC/mm^3	ATIVADA%	ATIVADA/mm^3
1	**1,1745**	0,0010	**0,0810**
2	**0,9009**	0,0051	**0,5049**
3	**2,9050**	0,0104	**0,7280**
4	**0,2376**	0,0033	**0,2376**
5	**1,9152**	0,0160	**0,8960**
6	**0,3570**	0,0020	**0,1400**
7	**0,9222**	0,0144	**0,7632**
8	**1,4208**	0,0042	**0,2688**
9	**0,3840**	0,0053	**0,3180**
10	**1,9116**	0,0109	**0,5886**
11	**4,8138**	0,0061	**0,4331**
12	**0,8510**	0,0010	**0,0740**
13	**0,5280**	0,0011	**0,0660**
14	**1,3520**	0,0095	**0,7600**
15	**2,3904**	0,0033	**0,2376**
16	**0,6840**	0,0021	**0,0945**
17	**0,0000**	0,0000	**0,0000**
18	**0,2100**	0,0030	**0,2100**
19	**2,2608**	0,0052	**0,3744**
20	**0,4140**	0,0051	**0,2295**
21	**1,7760**	0,0106	**0,6360**
22	**2,0592**	0,0099	**0,7128**

N,	CEC/mm^3	ATIVADA%	ATIVADA/mm^3
23	**1,3310**	0,0095	**0,5225**
24	**1,8000**	0,0123	**0,5535**
25	**1,3750**	0,0187	**0,9350**
26	**1,3992**	0,0000	**0,0000**
27	**1,3440**	0,0085	**0,5100**
28	**0,6468**	0,0044	**0,1848**
29	**2,4696**	0,0155	**0,9765**
30	**0,4120**	0,0000	**0,0000**

ANEXO H

CARACTERIZAÇÃO DAS POPULAÇÕES PORTADORA DE HTLV1 E CONTROLE SAUDÁVEL SEGUNDO SEXO, IDADE E LEUCOMETRIA

HTLV1+				CONTROLE SAUDÁVEL			
N,	IDADE	SEXO	LEUC (cels/mm^3)	N,	IDADE	SEXO	LEUC (cels/mm^3)
1	51	F	5600	1	45	M	8100
2	53	M	4800	2	29	F	9900
3	33	M	6600	3	30	F	7000
4	48	F	7000	4	46	F	7200
5	51	F	4000	5	61	F	5600
6	57	F	5600	6	52	F	7000
7	35	M	9700	7	51	F	5300
8	49	M	6800	8	29	M	6400
9	40	F	9200	9	47	F	6000
10	46	M	6400	10	56	M	5400
11	42	M	8400	11	40	F	7100
12	32	F	6900	12	29	F	7400
13	34	F	4700	13	30	M	6000
14	55	M	5500	14	31	F	8000
15	32	F	9400	15	28	F	7200
16	56	M	4900	16	52	F	4500
17	61	M	7300	17	63	M	6200
18	27	F	14400	18	61	M	7000
19	45	F	12400	19	40	F	7200
20	65	F	4200	20	57	M	4500
21	48	M	7400	21	32	M	6000
22	31	F	8400	22	41	M	7200
23	32	F	8900	23	47	M	5500

HTLV1+				CONTROLE SAUDÁVEL			
N,	**ID**	**SEX**	**LEUC (cels/mm^3)**	**N,**	**IDADE**	**SEXO**	**LEUC (cels/mm^3)**
24	35	M	4800	24	48	M	4500
25	43	F	4300	25	49	F	5000
26	41	F	9700	26	28	F	10600
27	45	F	5200	27	41	F	6000
-	-	-	-	28	55	F	4200
-	-	-	-	29	20	F	6300
-	-	-	-	30	61	F	4000

ANEXO I

PERFIL IMUNOFENOTÍPICO DOS PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DE HTLV1

INICIAIS	ID	SEX	LEUCOCITOS (cels/mm^3)	LINF, %	LINF, (cels/mm^3)	CD3 %	CD4 %	CD8 %	CD25 %	CD4/CD8
JSP	51	F	5600	24,2	1355,2	74	53	17	23	3,12
DNS	53	M	4800	32,9	1579,2	75	44	27	19	1,63
ENS	33	M	6600	41,7	2752,2	71	38	32	19	1,19
IFS	48	F	7000	31,7	2219	76	37	33	21	1,12
CLN	51	F	4000	38,8	1552	71	35	33	21	1,06
MYM	57	F	5600	28,6	1601,6	73	38	31	14	1,23
OBL	35	M	9700	17	1649	72	36	36	18	1,00
JVS	49	M	6800	47,2	3209,6	71	27	41	14	0,66
MPJ	40	F	9200	21	1932	81	58	25	29	2,32
BS	46	M	6400	55	3520	68	31	35	16	0,89
SEM	42	M	8400	26,7	2242,8	68	39	22	7	1,77
MVS	32	F	6900	40,1	2766,9	77	47	32	23	1,47
SPNCA	34	F	4700	24,9	1170,3	78	47	30	26	1,57
JPS	55	M	5500	36,1	1985,5	73	46	26	11	1,77
ACPA	32	F	9400	25,2	2368,8	80	50	27	13	1,85
HFS	56	M	4900	25,6	1254,4	73	48	22	28	2,18
MAE	61	M	7300	31	2263	78	53	21	22	2,52
LM	27	F	14400	47,6	6854,4	83	63	18	57	3,50
HCS	45	F	12400	20,9	2591,6	70	44	23	35	1,91
ASC	65	F	4200	34,5	1449	65	52	12	20	4,33
JFS	48	M	7400	34,1	2523,4	60	46	13	13	3,54
RAML	31	F	8400	30	2520	72	36	30	8	1,20
ABS	32	F	8900	32,5	2892,5	72	43	26	14	1,65
AFP	35	M	4800	30,4	1459,2	72	37	33	21	1,12
ZFS	43	F	4300	34,8	1496,4	76	50	24	28	2,08
AELC	41	F	9700	30,4	2948,8	74	49	19	27	2,58
DDN	45	F	5200	30,6	1591,2	77	52	25	27	2,08

ANEXO J

CARGA PRÓ-VIRAL DOS PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DE HTLV1

N	CARGA PRÓ-VIRAL (cópias/10^6 células PBMC)
1	1
2	14
3	0
4	57
5	8
6	1
7	10
8	0
9	4
10	24
11	31
12	3
13	1
14	5
15	704
16	1
17	1
18	130
19	4
20	46
21	51
22	29
23	1
24	1
25	14
26	4
27	18

9. REFERÊNCIAS

Aboudola S, Kini AR. Angiogenesis in lymphoproliferative disorders: a therapeutic target? *Curr Opin Hematol*. 2005;12(4):279-83.

Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res*. 2007a;100(2):158-73.

Aird WC. Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res*. 2007b;100(2):174-90.

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.* 1999;198(1):1-10.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, *et al*. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science. 1997;275(5302):964-7.

Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Aboud M. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type I leukemogenicity. *Retrovirology*. 2004;1:20.

Barmak K, Harhaj E, Grante C, Alefatis T, Wigdahl B. Human T cell leukemia vírus type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. *Virology.* 2003;308:1-12.

Bazarbachi A, Hermine O. Treatment of adult T-cell leukaemia/lymphoma: current strategy and future perspectives. *Virus Res*. 2001;78(1-2):79-92.

Bazarbachi A, Abou MR, Gessain A, Talhouk R, El-Khoury H, Nasr R, *et al.* Human T-cell lymphotropic virus type I-infected cells extravasate through the endothelial barrier by a local angiogenesis-like mechanism. *Cancer Res.* 2004;64(6):2039-46.

Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM, *et al.* Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost*. 2005;93(2):228-35.

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, *et al.* Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood. 1998;91(10):3527-61.

Cortelezzi A, Fracchiolla NS, Mazzeo LM, Silvestris I, Pomati M, Somalvico F, *et al*. Endothelial precursors and mature endothelial cells are increased in the peripheral blood of myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma.* 2005; 46:1345-51.

Coskun AK, Sutton RE. Expression of glucose transporter 1 confers susceptibility to human T-cell leukemia virus envelope-mediated fusion. *J Virol*. 2005;79(7):4150-8.

Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ. Patologia, Estrutural e Funcional. Guanabara Koogan, 6th ed. 2000;233-95.

Del Papa N, Colombo G, Fracchiolla N, Moronetti LM, Ingegnoli F, Maglione W, *et al.* Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(4):1296-304.

Delorme B, Basire A, Gentile C, Sabatier F, Monsonis F, Desouches C, *et al*. Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells. *Thromb Haemost*. 2005;94(6):1270-9.

Duda DG, Cohen KS, di TE, Au P, Klein RJ, Scadden DT, *et al*. Differential CD146 expression on circulating versus tissue endothelial cells in rectal cancer patients: implications for circulating endothelial and progenitor cells as biomarkers for antiangiogenic therapy. *J Clin Oncol*. 2006;24(9):1449-53.

El-Sabban ME, Merhi RA, Haidar HA, Arnulf B, Khoury H, Basbous J, *et al*. Human T-cell lymphotropic virus type 1-transformed cells induce angiogenesis and establish functional gap junctions with endothelial cells. *Blood*. 2002;99(9):3383-9.

Elshal MF, Khan SS, Takahashi Y, Solomon MA, McCoy JP, Jr. CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of

lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood*. 2005;106(8):2923-4.

Fadini GP, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes. *Diabetes Care.* 2007;30(5):1305-13.

Fidler IJ, Ellis LM. Neoplastic angiogenesis--not all blood vessels are created equal. *N Engl J Med*. 2004;351(3):215-6.

Gallo RC. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*. 2005;2:2-17.

Grefte A, van der Giessen M, van Son W, The TH. Circulating cytomegalovirus (CMV) – infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J Infect Dis.* 1993;167:270-7.

Grisar J, Aletaha D, Steiner CW, Kapral T, Steiner S, Seidinger D, *et al.* Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Circulation*. 2005;111(2):204-11.

Gupta K, Zhang J. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgrad Med J.* 2005; 81:236-42.

Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: isolation and characterization. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13(5):201-6.

Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*. 2004;8(4):498-508.

Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005;106(5):1525-31.

Iwami Y, Masuda H, Asahara T. Endotelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J Cell Mol Med*. 2004;8(4):488-97.

Kannagi M, Ohashi T, Harashima N, Hanabuchi S, Hasegawa A. Immunological risks of adults T-cell leukemia at primary HTLV-I infection. *Trends Microbiol.* 2004; 12(7):346-52.

Kchour G, Makhoul NJ, Mahmoudi M, Kooshyar MM, Shirdel A, Rastin M, *et al.* Zidovudine and interferon-alpha treatment induces a high response rate and reduces HTLV-1 proviral load and VEGF plasma levels in patients with adult T-cell leukemia from North East Iran. *Leuk Lymphoma*. 2007;48(2)330-6.

Kchour G, Tarhini M, Sharifi N, Farid R, Khooei AR, Shirdel A, *et al*. Incresaed microvessel density in involved organs from patients with HTLV-I associated adult T cell leukemia lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2008;49(2):265-70.

Khakoo AY, Finkel T. Endothelial progenitor cells. *Annu Rev Med*. 2005;56:79-101.

Khan SS, Solomon MA, McCoy JP, Jr. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005;64(1):1-8.

Kopfstein L, Christofori G. Metastasis: cell-autonomous mechanisms versus contributions by the tumor microenvironment. *Cell Mol Life Sci.* 2006; 63:449-68.

Kopp HG, Ramos CA, Rafii S. Contribution of endothelial progenitors and proangiogenic hematopoietic cells to vascularization of tumor and ischemic tissue. *Curr Opin Hematol.* 2006;13(3):175-81.

Korkolopoulou P, Viniou N, Kavantzaz N, Patsouris E, Thymara I, Pavlopoulos PM, *et al*. Clinicopathologic correlations of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia: a morphometric study. *Leukemia.* 2003; 17: 89-97.

Kyriakou DS, Alexandrakis MG, Kyriakou ES, Liapi D, Kourelis TV, Passam F, *et al.* Activated peripheral blood and endothelial cells in thalassemia patients. *Ann Hematol.* 2001;80(10):577-83.

Lamalice L, Le BF, Huot J. Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*. 2007;100(6):782-94.

Lamping K. Endothelial progenitor cells: sowing the seeds for vascular repair. *Circ Res*. 2007;100(9):1243-5.

Lee KW, Lip GY, Tayebjee M, Foster W, Blann AD. Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood.* 2005;105(2):526-32.

Lefevre P, George F, Durand JM, Sampol J. Detection of circulating endothelial cells in thrombotic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost.* 1993;69(5):522.

Levine PH, Cleghorn F, Manns A, Jaffe ES, Navarro-Roman L, Blattner WA, *et al.* Adult T-cell leukemia/lymphoma: a working point-score classification for epidemiological studies. *Int J Cancer*. 1994;15;59(4):491-3.

Li HC, Biggar RJ, Miley WJ, Maloney EM, Cranston B, Hanchard B, *et al*. Provirus Load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. *J infect Dis*. 2004;12(7):346-52.

Machuca A, Rodes B, Soriano V. The effect of antiretroviral therapy on HTLV infection. *Virus Res*. 2001;78(1-2):93-100.

Magrath, I. The Non-Hodgkin's Lymphomas. Second Edition, New York: Arnold and Oxford University Press; 1997.

Mahieux R, Gessain A. HTLV-1 and associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Rev Clin Exp Hematol*. 2003;7(4):336-61.

Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G, Bertolini F. Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood*. 2001;97(11):3658-61.

Marriot SJ, Semmes OJ. Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and cellular DNA damage repair response. *Oncogene*. 2005; 24:5986-95.

Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, *et al.* Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood.* 2005;105(1):199-206.

Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia. *Oncogene.* 2003;22(33)5131-40.

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

Melero-Martin JM, Khan ZA, Picard A, Wu X, Paruchuri S, Bischoff J. *In vivo* vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. *Blood.* 2007;109(11):4761-8.

Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL, Haas TL. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol*.2006; 38: 333-57.

Mori N, Sato H, Hayashibara T, Senba M, Hayashi T, Yamada Y, *et al.* Human T-cell leucemia virus type I Tax transactivotes the matriz metalloproteinase-9 gene: potencial role in mediating adult T-cell leucemia invasiveness. *Blood.* 2002;99:1341-9.

Moroni G, Del PN, Moronetti LM, Vitali C, Maglione W, Comina DP, *et al*. Increased levels of circulating endothelial cells in chronic periaortitis as a marker of active disease. *Kidney Int*. 2005;68(2):562-8.

Murasawa S, Asahara T. Endothelial Progenitor Cells for vasculogenesis. *Physiology*. 2005;20:36-42.

Mutunga M, Fulton B, Bullock R, Batchelor A, Gascoigne A, Gillespie JI, *et al.* Circulating endothelial cells in patients with septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(1):195-200.

Nakamaru Y. Immunological analysis of HTLV-I env-pX transgenic rat with various collagen vascular disease. *Hokkaido Igaku Zasshi.* 1997;72(5):529-44.

Nakamaru Y, Ishizu A, Ikeda H, Sugaya T, Fugo K, Higuchi M, *et al.* Immunological Hyperresponsiveness in HTLV-I LTR-env-pX transgenic rats: a prototype animal model for collagen vascular and HTLV-I-related inflammatory diseases. *Pathobiology*. 2001;69(1):11-8.

Neri D, Bicknell R. Tumor vascular targeting. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:436-46.

Nicot C. Current views in HTLV-I-associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Hematol*. 2005;78(3):232-9.

Nobre V, Guedes AC, Proietti FA, Stanciolli E, Martins ML, Serufo JC, *et al.* Dermatologic lesions in patients infected with the human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(1):43-52.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, *et al*. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells

identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000;95(3):952-8.

Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukaemia. *Am J Pathol.* 1997;150:815-821.

Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood*. 2005;105(4):1383-95.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. 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* .1980;77(12):7415-9.

Pombo de Oliveira MS, Loureiro P, Bittencourt A, Chiattone C, Birducchi D, De Carvalho SM, *et al*. Geographic diversity of adult T-cell leukemia/lymphoma in Brazil. The Brazilian ATLL Study Group. *Int J Cancer.* 1999;83(3):291-8.

Prater DN, Case J, Ingram DA, Yoder MC. Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia*. 2007;21(6):1141-9.

Proietti ABFC. HTLV-I/II. *Cadernos do Hemominas*. Volume XI. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais; 2000.

Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*. 2005;24(39):6058-68.

Rafat N, Hanusch C, Brinkkoetter PT, Schulte J, Brade J, Zijlstra JG, *et al.* Increased circulating endothelial progenitor cells in septic patients: correlation with survival. *Crit Care Med*. 2007;35(7):1677-84.

Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer*. 2002;2(11):826-35.

Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2004;8(3):294-300.

Ribatti D, Vacca A. Therapeutic renaissance of thalidomide in the treatment of haematological malignancies. *Leukemia*. 2005;19:1525-31.

Rumpold H, Wolf D, Koeck R, Gunsilius E. Endothelial progenitor cells: a source for therapeutic vasculogenesis? *J Cell Mol Med.* 2004; 8:509-18.

Sasaki H, Nishikata I, Shiraga T, Akamatsu E, Fukami T, Hidaka T, *et al*. Overexpression of a cell adhesion molecule, TSLC1, as a possible molecular marker for acute-type adult T-cell leukemia. *Blood.* 2005;105(3):1204-13.

Schneider M, Tjwa M, Carmeliel P. A surrogate maker to monitor angiogenesis at last. *Cancer Cell*. 2005;7(1):3-4.

Semmes OJ, Cazares LH, Ward MD, Qi L, Moody M, Maloney E, *et al*. Discrete serum protein signatures discriminate between human retrovirus-associated hematologic and neurologic disease. *Leukemia.* 2005; 19(7):1229-38.

Shaffer RG, Greene S, Arshi A, Supple G, Bantly A, Moore JS, *et al*. Flow cytometric measurement of circulating endothelial cells: the effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations. *Cytometry B Clin Cytom*. 2006;70(2):56-62.

Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med*.1997;337(22):1584-90.

Solovey A, Gui L, Key NS, Hebbel RP. Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia. *J Clin Invest*. 1998;101(9):1899-904.

Strijbos MH, Kraan J, den Bakker MA, Lambrecht BN, Sleijfer S, Gratama JW. Cells meeting our immunophenotypic criteria of endothelial cells are large platelets. *Cytometry B Clin Cytom.* 2007;72(2):86-93.

Stump MM, Jordan Jr GL, Debakey ME, Halpert B. Endothelium grown from circulating blood on isolated intravascular Dacron hub. *Am J Pathol*. 1963;43:361-7.

Takatsuki K. Discovery of adult T-cell leukemia. *Retrovirology.* 2005;2:16.

Taylor GP, Matsuoka M. Natural History of adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Am J Hematol*. 2005;24:6047-57.

Van Zaanen HC, Pegels JG. Adult T-cell leukaemia and lymphoma: report of two cases and a brief review of the literature. *Neth J Med*. 2002;60(8):330-3.

Vine AM, Heaps AG, Kaftantzi L, Mosley A, Asquith B, Witkover A. The role of CTLs in persistent viral infection: cytolytic gene expression in CD8+ lymphocytes distinguishes between individuals with a high or low proviral

load of human T cell lymphotropic vius type 1. *J Immunol*. 2004;173:5121-29.

Wierzbowska A, Robak T, Krawczynska A, Wrzesien-Kus A, Pluta A, Cebula B, *et al*. Circulating endothelial cells in patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2005;75(6):492-7.

Wu JX, Xu BL, Huang WL. Research advancement of endogenous angiogenesis inhibitors. *Ai Zheng.* 2005; 243:376-384.

Yasunaga J, Matsuoka M. Leukemogenesis of adult T-cell leukemia. *Int J Hematol*. 2003;78(4):312-20.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, *et al*. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 1997;90(12):5002-12.

Yoshida M. Discovery of HTLV-1, the first human retrovirus, its unique regulatory mechanisms, and insights into pathogenesis. Oncogene. 2005;24:5932-7.

Yoshida M, Jeang KT. Preface to 25 years of HTLV-1 and ATL research. *Oncogene.* 2005;24:5925.

Zammaretti P, Zisch AH. Adult 'endothelial progenitor cells'. Renewing vasculature. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(3):493-503.

Zhang H, Vakil V, Braunstein M, Smith EL, Maroney J, Chen L, *et al*. Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance. *Blood.* 2005;105(8):3286-94.

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