



BAHIANA
ESCOLA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E SAÚDE HUMANA

ERIKA MARIA DE MACEDO COSTA

**EFEITO DO LASSBio-1386 EM CÉLULAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO
HTLV-1**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Salvador - Bahia

2019

ERIKA MARIA DE MACEDO COSTA

**EFEITO DO LASSBio-1386 EM CÉLULAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO
HTLV-1**

Dissertação apresentada ao curso de Pós Graduação em Medicina e Saúde Humana da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Medicina e Saúde Humana

Orientador: Prof^a Dra Maria Fernanda Rios Grassi

Co-orientadora: Prof^a. Dra Giselle Calasans

Salvador

2019

C837 Costa, Erika Maria de Macedo.
Efeito do LASSBio-1386 em células de indivíduos infectados pelo
HTLV-1/ Erika Maria de Macedo Costa. – Salvador, 2019
51f.: il.

Inclui anexos.

Orientadora: Maria Fernanda Rios Grassi.

Co-orientadora: Giselle Calazans

Dissertação (mestrado) medicina e saúde humana – Escola Bahiana
de Medicina e Saúde Pública.

1. HTLV-1. 2. Derivado N-acil-Hidrazona. 3. HAM/TSP. 4. Proliferação
de linfócitos. I. Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública – EBMSP. II.
Grassi, Maria Fernanda Rios. III. Calazans, Giselle. IV. Título.

CDU 61

ERIKA MARIA DE MACEDO COSTA

**“EFEITO DO LASSBio-1386 EM CÉLULAS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS
PELO HTLV-1”**

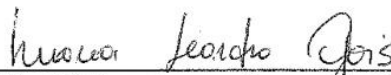
Dissertação apresentada à Escola
Bahiana de Medicina e Saúde
Pública, como requisito parcial para
a obtenção do Título de Mestre em
Medicina e Saúde Humana.

Salvador, 27 de junho de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Everton da Silva Batista
Doutor em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
Universidade Salvador, UNIFACS



Prof.^a Dra. Luana Leandro Gois
Doutora em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP



Profa. Dra. Lea Maria dos Santos Lopes
Doutora em Medicina e Saúde Humana
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP

Dedico este trabalho a Deus que me deu forças para vencer todos obstáculos, ao meu esposo que me incentivou durante toda essa longa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a Profa. Dra. Maria Fernanda Rios Grassi por todo conhecimento e pela oportunidade de poder contribuir para pesquisa, pela confiança, amizade e paciência.

Agradeço à Profa. Dra. Giselle Calasans pelo incentivo e aprendizado durante essa jornada.

Agradecimento para Dra Milena, Dr. Diogo, Prof. Dr. Bernardo Galvão e Prof. Dr. Cássio Meira pelo auxílio durante esta caminhada.

Agradeço a equipe do Centro de HTLV, em especial Noilson e Thessika.

Agradeço também a todos os professores do Mestrado de Medicina e Saúde Humana da EB-MSP.

Agradecimento à Jaqueline Lima IC que contribuiu com o auxílio na realização dos experimentos, discussão dos temas e divisão de conhecimento.

Agradeço também aos voluntários participantes da pesquisa por consentirem a realização deste trabalho.

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS

Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública - EBMSP

Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz – Fundação Oswaldo Cruz, Bahia - IGM

FONTES DE FINANCIAMENTO

Fiocruz – Proep (Programa de Excelência em Pesquisa)

RESUMO

Introdução: O HTLV-1 é o agente etiológico da Leucemia Linfoma de Células T do Adulto (ATL) e Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP). Está relacionado também a outras doenças inflamatórias como uveíte, artrites, dermatites, polimiosites e alveolites. Poucos tratamentos são disponíveis para sintomáticos portadores de HTLV-1. O derivado de N-acilhidrazona, o LASSBio-1386, possui atividade imunomoduladora, antiproliferativa e anti-inflamatória e não foi estudado ainda no contexto do HTLV-1. **Objetivo:** Determinar o efeito do composto LASSBio-1386 in vitro sobre a proliferação, ciclo celular, apoptose, necrose e na carga proviral em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos infectados pelo HTLV-1. **Métodos:** Trata-se de um estudo experimental em indivíduos assintomáticos, indivíduos com diagnóstico de HAM / TSP e em voluntários da Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz), com idade igual ou superior a 18 anos, atendidos no Centro de HTLV da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública de Salvador. A IC50 foi obtida através de linfoblastos cultivados na presença e na ausência de diferentes concentrações de LASSBio 1386, em seguida foi avaliada a inibição da proliferação na PBMC dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e com HAM/TSP na presença e na ausência do composto. Para avaliar a morte celular foi realizado ensaio sobre indução de apoptose/ necrose e ciclo celular por citometria de fluxo na PBMC de HAM/TSP e de assintomáticos. Para determinar o efeito antiviral de LASSBio 1386 foi realizada a quantificação da carga proviral na PBMC de indivíduos infectados HAM/TSP e assintomáticos na presença e na ausência do composto. **Resultados:** O IC50 do LASSBio-1386 foi de 1 μ M. A inibição de proliferação de linfócitos observada na concentração de 1 μ M foi de 32% nas células dos indivíduos com HTLV-1 assintomáticos e no grupo HAM/TSP foi de 72%. Quanto a análise do ciclo celular, apoptose e necrose não houve diferença de resultado na análise dos grupos de indivíduos na presença de LASSBio-1386. A carga proviral reduziu 43,4% na presença do composto nas células dos indivíduos com HTLV-1 assintomáticos e 67% nos indivíduos com HAM/TSP. **Conclusão:** LASSBio-1386 tem um efeito antiproliferativo em células de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e reduz a carga proviral.

Palavras-chave: HTLV-1. Derivado N-acil-Hidrazona. HAM/TSP. Proliferação de linfócitos.

ABSTRACT

Introduction: HTLV-1 is the etiological agent of Adult T-cell Lymphoma Leukemia (ATL) and HTLV-1 Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis (HAM / TSP). It is also related to other inflammatory diseases such as uveitis, arthritis, dermatitis, polio-sites and alveolitis. Few treatments are available for symptomatic patients with HTLV-1. The N-acylhydrazone derivative, LASSBio-1386, has immunomodulatory, antiproliferative and anti-inflammatory activity and has not been studied in the context of HTLV-1. **Objective:** To determine the effect of LASSBio-1386 compound in vitro on proliferation, cell cycle, apoptosis, necrosis and proviral load in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of HTLV-1 infected individuals. **Methods:** This is an experimental study in asymptomatic individuals, individuals diagnosed with HAM / TSP, and volunteers from the Osvaldo Cruz Foundation (Fiocruz), aged 18 years or older, who attended the HTLV Center of the Bahiana School of Medicine and Health. Salvador City. IC50 was obtained from lymphoblasts cultured in the presence and absence of different concentrations of LASSBio 1386, and then inhibition of PBMC proliferation of asymptomatic HTLV-1 and HAM / TSP infected individuals in the presence and absence of the compound was evaluated. To evaluate cell death, an assay was performed on apoptosis / necrosis and cell cycle induction by flow cytometry in HAM / TSP and asymptomatic PBMC. To determine the antiviral effect of LASSBio 1386, the PBMC proviral load was quantified in HAM / TSP and asymptomatic infected individuals in the presence and absence of the compound. **Results:** The IC50 of LASSBio-1386 was 1 μ M. The inhibition of lymphocyte proliferation observed at 1 μ M concentration was 32% in the cells of asymptomatic HTLV-1 subjects and in the HAM / TSP group was 72%. Regarding cell cycle analysis, apoptosis and necrosis, there was no difference in results in the analysis of groups of individuals in the presence of LASSBio-1386. Proviral load decreased 43.4% in the presence of the compound in cells of asymptomatic HTLV-1 subjects and 67% in HAM / TSP subjects. **Conclusion:** LASSBio-1386 has an antiproliferative effect on cells of HTLV-1 infected individuals and reduces proviral load.

Key words: HTLV-1. N-acyl-hydrazone derivative. HAM / TSP. Lymphocyte proliferation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Estrutura geral de hidrazonas..... | 21 |
| Figura 2 - Reação geral de formação de uma hidrazona (1) e reação geral de formação de uma acilhidrazona (2) | 21 |
| Figura 3 - LASSBio-1386 | 23 |
| Figura 4 - Porcentagem de inibição de proliferação de linfócitos..... | 30 |
| Figura 5 - Efeito do LASSBio-1386 sobre o ciclo celular.. .. | 31 |
| Figura 6 - Porcentagem de PBMC em apoptose e necrose. | 33 |
| Figura 7 - Carga proviral. | 34 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ciclo celular. 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------------------------------|--|
| AMPc | (Cyclic adenosine monophosphate) Monofosfato cíclico de adenosina |
| ATL | (<i>Adult T-cell Leukemia/Lymphoma</i>) Leucemia/Linfoma de células T do Adulto |
| COX | Ciclooxigenase |
| CPV | Carga Proviral |
| CTL | (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>) Linfócitos T citotóxicos |
| EBMSP | Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública |
| GM- CSF | (<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>) Fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos |
| GMPc | (Cyclic guanosine monophosphate) Monofosfato cíclico de guanosina |
| Gp | Glicoproteínas de superfície |
| HAM/TSP | (Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis) Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical |
| HBZ | (<i>HTLV-I basic ZIP factor</i>) |
| HTLV-1 | (<i>Human T Lymphotropic Virus 1</i>) Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 |
| HTLV-2 | (<i>Human T Lymphotropic Virus 2</i>) Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 2 |
| IC-50 | Concentração inibitória do composto que reduz a proliferação celular em 50% |
| IL | Interleucina |
| INF- γ | Interferon gama |
| INF- α | Interferon alfa |
| LTR | <i>Long Terminal Repeat</i> (Repetições Terminais Longas) |
| NAHs | N-acilhidrazonas |
| NK | Natural killer |
| NFKB | (<i>Nuclear Factor kappa B</i>) Fator de transcrição nuclear |
| PCR | (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) Reação em Cadeia da Polimerase |
| PBMC | (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>) Células Mononucleares do Sangue Periférico |
| PDEs | (<i>cyclic nucleotide phosphodiesterases</i>) Fosfodiesterase nucleotídicas cíclicas |

| | |
|--------------|---|
| PDE-4 | <i>(Phosphodiesterase 4)</i> Fosfodiesterase 4 |
| PHA | <i>(fitohemagglutinin)</i> Fitohemaglutinina |
| RNA | <i>(Ribonucleic acid)</i> Ácido ribonucleico |
| TP | <i>(transmembran protein)</i> proteína transmembrana |
| TNF | <i>(tumor necrosis factor)</i> Fator de necrose tumoral |
| μL | Microlitro |
| uM | Micromolar |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 | Estrutura do HTLV-1 | 15 |
| 2.2 | Transmissão | 16 |
| 2.3 | Proliferação Celular Espontânea | 16 |
| 2.4 | Carga proviral | 18 |
| 2.5 | Doenças Associadas | 18 |
| 2.6 | Tratamento | 19 |
| 2.7 | Hidrazonas e seus derivados | 20 |
| 3 | OBJETIVOS | 24 |
| 3.1 | Objetivo Geral | 24 |
| 3.2 | Específicos | 24 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 25 |
| 4.1 | Desenho do estudo | 25 |
| 4.2 | Seleção da população | 25 |
| 4.2.1 | Critérios de inclusão | 25 |
| 4.2.2 | Critérios de exclusão | 25 |
| 4.3 | Considerações éticas | 25 |
| 4.4 | Coleta de sangue dos indivíduos avaliados, obtenção de linfoblastos e cultura celular | 26 |
| 4.5 | Determinação do IC₅₀ (concentração inibitória de 50%) | 26 |
| 4.6 | Inibição de Proliferação Celular | 27 |
| 4.7 | Ciclo Celular | 27 |
| 4.8 | Apoptose e Necrose | 27 |
| 4.9 | Quantificação da carga proviral do HTLV-1 | 28 |
| 4.9.1 | Análises dos dados | 28 |
| 5 | RESULTADOS | 29 |
| 5.1 | Determinação da IC₅₀ (Concentração inibitória de 50%) de LASSBio-1386 em PBMC de indivíduos não-infectados pelo HTLV-1 | 29 |
| 5.2 | Inibição da proliferação celular em indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e com HAM/ TSP | 29 |
| 5.3 | Análise do ciclo celular dos indivíduos HTLV-1 e Assintomáticos e HAM/TSP | 30 |
| 5.4 | Apoptose e Necrose | 33 |
| 5.5 | Carga proviral | 33 |
| 6 | DISCUSSÃO | 35 |
| 7 | LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DO ESTUDO | 37 |
| 8 | CONCLUSÃO | 38 |
| | REFERÊNCIAS | 39 |
| | APÊNDICES | 46 |
| | ANEXOS | 48 |

1 INTRODUÇÃO

O vírus linfotrófico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) está associado ao desenvolvimento de doenças graves como a leucemia/linfoma de Células T do adulto (ATLL) e mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), além de síndromes inflamatórias e complicações infecciosas. No entanto, o desenvolvimento dessas doenças varia na população infectada, estima-se que 2 a 3% dos indivíduos infectados desenvolvem ATLL e cerca de 0,25% a 4% desenvolvem o HAM/TSP. Ainda não se sabe porque a infecção pelo HTLV-1 permanece assintomática na maioria dos portadores⁽¹⁾. As principais áreas endêmicas da infecção compreendem África, América do Sul e Japão. Excetuando-se o Japão, a maioria destes concentra-se nas áreas subtropicais e tropicais com baixos índices de desenvolvimento humano. Regiões como o sul da África, Caribe e algumas regiões da América do Sul e da América Central apresentam alta prevalência da infecção. O Brasil é o país da América do Sul com maior número absoluto de indivíduos infectados pelo HTLV-1, possuindo uma estimativa de cerca de 800.000 portadores⁽²⁾ e em Salvador, cerca de 1,8% da população geral está infectada, sendo considerada a cidade brasileira com a maior prevalência da infecção⁽³⁾. Apesar da infecção pelo HTLV-1 estar associada à HAM/TSP, à ATLL, a outras doenças infecciosas e inflamatórias e a maioria destas patologias não apresentarem cura ou algum tratamento específico, a infecção pelo HTLV-1 é considerada negligenciada⁽⁴⁾.

Os indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam proliferação celular espontânea e níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias maiores que indivíduos não infectados⁽⁵⁾, apresentam maiores níveis de interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IL-6 (interleucina 6) e redução de níveis de IL-4 quando comparados aos indivíduos não portadores de HTLV-1 e a alta carga proviral é um importante marcador biológico para o desenvolvimento das manifestações clínicas associadas ao vírus na HAM/TSP e ATLL⁽⁶⁾.

O tratamento da ATLL é a quimioterapia convencional associada a antirretrovirais e não apresenta boa resposta terapêutica. O tratamento da infecção pelo HTLV-1 é indicado quando ocorre sintomas associados a infecção. Pacientes com doenças inflamatórias, especialmente, HAM/TSP, normalmente fazem uso de corticosteróides como prednisolona e IFN- α ⁽⁷⁻⁹⁾, porém devido a toxicidade e os efeitos colaterais causados pelo uso destas terapias, há a necessidade da procura de novos agentes farmacológicos para o tratamento sintomático desta doença.

Os derivados de N-acilhidrazonas (NAHs) representam uma classe de compostos caracterizados por uma estrutura do tipo $R_1R_2C=NNHCOR$, usada como modelo para derivar drogas multi-alvo. Eles receberam considerável atenção devido a sua importância biológica na química medicinal, por exibirem amplo espectro de efeitos biológicos incluindo inibição de fosfodiesterase 4 (PDE-4) e atividades anti-inflamatórias, antitumoral, antiviral, antioxidante, antiparasitária e antiplaquetárias⁽¹⁰⁻¹²⁾.

O LASSBio-1386 é um derivado de N-acilhidrazona metilado [(E) -N'- (3,4-dimetoxibenzilideno) – 4 - metoxibenzo-hidrazida (LASSBio-1386)], foi sintetizado pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. Ele atua reduzindo a resistência vascular pulmonar e a pressão do ventrículo direito, estabilizando a hipertensão pulmonar e reduzindo a disfunção endotelial⁽¹³⁾. Um estudo recente avaliou o efeito deste composto também em macrófagos e em culturas de esplenócitos de camundongos *in vitro* na qual a sua adição em concentrações não tóxicas (0,5, 1 e 2 μ M) diminuiu a linfoproliferação, os níveis de IFN- γ , a produção de IL-2 e induziu o ciclo celular a permanecer na fase G0/G1⁽¹⁴⁾.

No contexto da infecção pelo HTLV-1, com o conhecimento sobre as propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativas e antivirais evidenciadas pelos derivados de NAH, o objetivo deste estudo é determinar o efeito do composto LASSBio-1386 *in vitro* nas células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estrutura do HTLV-1

O vírus linfotrófico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus envelopado que pertence à família *Retroviridae*, sub-família *Oncovirinae*, gênero *Delta-virus*. Este vírus foi descrito em 1980 e primeiramente isolado a partir de uma linhagem de células linfoblastóides obtidas de PBMC de um paciente com linfoma cutâneo de células T e foi o primeiro retrovírus humano causador de doença a ser identificado⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. O HTLV do tipo 2 foi isolado a partir de células de um paciente com um tipo de leucemia de células pilosas⁽¹⁸⁾ e é considerado menos patogênico que o HTLV-1, não é associado até o momento a nenhuma doença linfoproliferativa⁽¹⁹⁾. O HTLV do tipo 3 e do tipo 4, foram isolados a partir de amostras de sangue de moradores de Camarões, na África, e não estão associados com o desenvolvimento de doenças nos indivíduos infectados⁽¹⁹⁻²¹⁾.

A estrutura da partícula viral é constituída basicamente por um envelope, uma matriz proteica e um nucleocapsídeo. O envelope constitui o único complexo protéico presente na superfície do vírion, consistindo de duas subunidades proteicas glicosiladas: a proteína de superfície, também referida como gp46, e a proteína transmembrana, denominada gp21 que ancora a gp46. Estas glicoproteínas são geradas a partir da clivagem da proteína precursora do envelope viral, a qual é codificada pelo gene estrutural *env*. Como no caso de outros retrovírus, ocorre associação não covalente entre a proteína de superfície e a proteína transmembrana, de modo que esta última ancora a proteína de superfície no envelope da partícula viral^(22,23). Seu genoma possui duas fitas de RNA simples envolvidas por um envelope viral. O gene *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa (p55), endonucleases e integrases (p32).

As glicoproteínas gp46 e gp21 estão diretamente associadas ao reconhecimento celular, e à conseqüente entrada do vírus na célula, funções relacionadas à sensibilização do sistema imune, ao reconhecimento do receptor na superfície da célula alvo, à fusão entre membranas e à transmissão célula-célula^(24,25). A interação entre o domínio de ligação do receptor, presente na gp46, e o complexo receptor na superfície da célula hospedeira permite o reconhecimento e a interação do vírus com a célula hospedeira e, conseqüentemente, a infecção pelo HTLV-1⁽²⁶⁾.

Além das proteínas estruturais, o genoma do HTLV-1 contém uma região gênica adicional, chamada *pX*, que inclui 4 matrizes abertas de leitura, parcialmente sobrepostas, responsável por codificar as proteínas regulatórias virais Tax, Rex e HBZ (*HTLV-1 basic Zip*

factor), e as proteínas acessórias p12, p13, p30. Apesar de Tax ser vista como o principal fator oncogênico das células infectadas, a sua expressão é consideravelmente reduzida, ao passo que a HBZ é expressa de maneira ampla e constante nas células de ATLL⁽²⁸⁾.

A Tax modula a síntese e a função de diversas proteínas regulatórias da célula infectada e atua como um transativador gênico viral. Rex atua promovendo a exportação de RNA viral do núcleo para o citoplasma e controlando o *splicing* e a degradação destes RNAs, mantendo o equilíbrio necessário para a produção viral. A proteína acessória p12 apresenta um importante papel na infecção viral de PBMCs quiescentes *in vivo*. Já a proteína p30 atua na ativação de diversos genes nas células infectadas pelo HTLV-1, na replicação viral e na manutenção da carga proviral na infecção⁽²⁹⁾.

A HBZ atua induzindo a proliferação das células infectadas pelo vírus e inibe a apoptose, colaborando na imortalização, manutenção e multiplicação das células de ATLL⁽²⁷⁾ inibe a expressão viral e dificulta o reconhecimento imunológico⁽³⁰⁾. O TNF e IL-1, são duas importantes citocinas pro-inflamatórias, são tanto ativadores quanto alvos transcrpcionais de NF- κ B⁽³¹⁾.

2.2 Transmissão

A transmissão do vírus ocorre por diversas formas: sexual, transfusão sanguínea, hemoderivados, compartilhamento de seringas/agulhas contaminadas, transmissão de mãe para filho associado com aleitamento materno. A transmissão vertical (de mãe para filho) tem sido considerada a rota predominante em áreas endêmicas e a soroprevalência aumenta com a idade, especialmente entre as mulheres^(32,33).

2.3 Proliferação Celular Espontânea

O HTLV-1 infecta preferencialmente linfócitos T CD4⁺, também os linfócitos T CD8⁺ e as células dendríticas. As células dendríticas são células apresentadoras de antígenos e tem a capacidade de estimular linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Há dois possíveis modelos de persistência do HTLV-1. Ambos os modelos permitem um grau de expressão viral e, em ambos os casos, o HTLV-1 se propaga principalmente pela divisão mitótica. No primeiro modelo, ocorre expansão clonal passiva de células infectadas, pois permite que as células infectadas escapem da vigilância imunológica. No segundo modelo, a expressão viral é essencial para a persistência, porque leva à divisão celular infectada. Há vários mecanismos pelos quais as proteínas virais

Tax e p12 aumentariam a divisão da célula infectada, causando desregulação de pontos de verificação do ciclo celular e redução no limiar de ativação de células T. A proliferação também pode ocorrer via receptor de superfície celular GLUT-1 (transportador de glicose 1) quando a partícula viral se liga a superfície da célula pela interação de glicoproteínas do envelope viral penetrando na célula liberando seu conteúdo. Os indivíduos infectados pelo HTLV-I tem uma porcentagem aumentada de linfócitos T CD4 + ativados (CD4 + HLA-DR +), o que sugere que a ativação de células T CD4 + pode ser um evento precoce para iniciar e propagar a resposta inflamatória desencadeada pelo HTLV-I. As células CD4 + ativadas podem ser uma fonte importante de IL-2 para proliferação e para o aumento de citocinas pró-inflamatórias relevantes para iniciar a resposta inflamatória desencadeada pelo HTLV-I. A ativação das células T CD8 +, diferente das células T CD4 +, é um evento tardio na infecção crônica pelo HTLV-I. A infecção pelo HTLV-I pode estar latente em muitas células T e, portanto, indetectável pelo sistema imunológico, o aparecimento de altos níveis de células T CD8 + ativadas é um evento tardio, um fato que também é consistente com o distúrbio neurológico lentamente progressivo denominado HAM / TSP. Tem sido sugerido que as células CD8 + poderiam auto-reagir com antígenos homólogos compartilhados entre o vírus e as estruturas da célula hospedeira, e que essa ação facilitaria os principais eventos imunológicos na HAM/TSP, uma vez que as células T CD8 + ativadas estão acumuladas no sangue periférico e líquido cefalorraquidiano enfatizando que este subconjunto de células estão intimamente ligados a eventos definitivos da doença. Níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias / regulatórias, como IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 também foram observados em indivíduos infectados⁽³⁴⁻³⁷⁾.

Com relação a ATLL, considera-se que a proteína Tax viral desempenha um papel central no processo, afeta a função de várias outras proteínas reguladoras por interação direta proteína-proteína. As células T infectadas evoluem em replicação contínua, ocorre descontrole no ciclo celular e na apoptose e o acúmulo de mutações que podem contribuir para o processo leucemogênico. Demonstrou-se que esta imortalização resulta da estimulação induzida por Tax das ciclinas CDK4 e CDK6. Suprime a apoptose pelo aumento de Bcl-2 e atua no mecanismo de proliferação de linfócitos pela produção de fatores de crescimento, como IL-2 e seu receptor⁽³⁸⁾. A proteína HBZ foi detectada não apenas em células ATLL, mas também em células T de portadores assintomáticos, esta correlacionada com a carga de provírus, induz a proliferação de células T infectadas pelo HTLV-1 e o aumento de células infectadas pelo HTLV-1 está associado a patogênese da HAM / TSP⁽³⁹⁾.

2.4 Carga proviral

Uma alta carga proviral em PBMC ocorre em indivíduos com HAM / TSP, e sua contagem pode ser usada como um marcador biológico de progressão da doença⁽⁶²⁾. É proporcionalmente inferior nos indivíduos assintomáticos, quando comparados com indivíduos com HAM/TSP⁽⁶³⁻⁶⁵⁾. É considerada baixa quando menos de 1% de PBMC carrega o provírus, intermediária quando 1% a 5% de PBMC está infectado e alta quando mais do que 5% do PBMC está infectado pelo vírus⁽⁶⁵⁾. Na infecção pelo HTLV-1, o risco de HAM / TSP aumenta exponencialmente quando a carga proviral excede 1% de PBMC porém esta condição isolada não é suficiente para o desenvolvimento do HAM/TSP.

2.5 Doenças Associadas

Está bem estabelecido que o HTLV-1 é o agente etiológico da ATLL, da HAM/TSP^(40,41), da uveíte associada ao HTLV-1⁽⁴²⁾ e da dermatite infectiva⁽⁴³⁾. Apesar da pequena incidência descrita para patologias associadas ao HTLV-1, os pacientes infectados pelo vírus podem cursar com diversas doenças de caráter inflamatório como a ceratoconjuntivite seca⁽⁴⁴⁾, polimiosite, artrite associada ao HTLV, pneumonia broncoalveolar e artropatia⁽¹⁹⁾. Além disso, outras manifestações neurológicas, como: doença do neurônio motor, neuropatia periférica, ataxia cerebelar e disfunção cognitiva têm sido igualmente associadas ao HTLV-1. A associação da infecção crônica pelo HTLV-1 com o desenvolvimento de doenças com características inflamatórias e neoplásicas sugere que pode haver algum grau de imunossupressão relacionada a esta infecção, o que explicaria o aumento da morbidade e mortalidade decorrentes de doenças infecciosas como tuberculose, hanseníase e escabiose severa em indivíduos infectados pelo HTLV-1⁽⁴⁵⁻⁵⁰⁾.

A HAM/TSP é uma síndrome neurológica desenvolve-se em até 4% dos indivíduos infectados. A patologia manifesta-se na faixa etária de 40-50 anos sendo mais prevalente em mulheres. O tempo entre a infecção primária e o início dos sinais da mielopatia pode variar de anos a décadas, isso também é explicado pelo difícil diagnóstico diferencial com outras neuromielopatias. As principais queixas associadas à doença são fraqueza nos membros inferiores, lombalgia, alterações sexuais, sintomas de noctúria, incontinência urinária e disfunção sexual. Pode evoluir para espasticidade e/ou hiperreflexia⁽⁵¹⁾. É uma neuropatia crônica que apresenta lesão inflamatória e desmielinizante dos neurônios motores causando perda progressiva da função motora em membros inferiores, podendo levar os indivíduos acometidos à

incapacidade motora permanente, constituindo um problema de saúde pública. Até o presente momento, o mecanismo da imunopatogenicidade da doença não foi elucidado, mas existem hipóteses para explicar a lesão medular. O dano neurológico poderia ocorrer por:

a) dano colateral: há uma resposta imune antiviral na qual os linfócitos T citotóxicos (CTLs) específicos contra o HTLV-1 e linfócitos T CD4⁺ infectados atravessam a barreira hematoencefálica e produzem uma resposta inflamatória liberando citocinas que destroem as células gliais;

b) citotoxicidade direta: ocorre pelo reconhecimento de células infectadas que atravessam a barreira hemato-encefálica e destroem as células infectadas por meio de atividade citotóxica direta ou pela liberação de citocinas pró-inflamatórias como interferon-alfa e fator de necrose tumoral alfa.

c) autoimunidade: ocorre a destruição das células da glia por mediadores liberados pelos CTLs que induziriam o sistema imunológico à destruírem os gliócitos por "confundirem" essas células com as infectadas pelo HTLV-1. A eficiência dos CTLs está relacionada inversamente com o risco de doenças inflamatórias associadas a infecção, como a HAM/TSP^(40,41).

A ATLL é uma doença linfoproliferativa agressiva, a incidência em indivíduos infectados é estimada entre 1 a 5% nas áreas endêmicas^(52,53). É dividida clinicamente nas formas: aguda, linfomatosa, crônica, *smoldering* e a forma tumoral primária de pele. Acomete principalmente após a quinta década de vida. A forma aguda da ATLL está associada a uma elevada mortalidade.

2.6 Tratamento

A indicação de tratamento do HTLV-1 aplica-se aos sintomáticos. No tratamento da ATL a quimioterapia, com a Zidovudina associada ao IFN- α e o transplante hematopoiético de células tronco tem mostrado alguns resultados. Com relação à HAM/TSP, ainda não há um tratamento que impeça a evolução da doença. Atualmente há diferentes terapêuticas disponíveis para tratar os sintomas dos pacientes com HAM/TSP, dentre os quais se destacam as drogas imunomoduladoras, corticosteroides visando reduzir a incapacidade e melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos. Porém, ainda não há consenso sobre qual seria a melhor intervenção e, quando indicada, qual o melhor imunomodulador para o tratamento da HAM/TSP⁽⁵⁴⁻⁵⁷⁾. O tratamento visa diminuir o processo inflamatório e aliviar os sinais e sintomas de espasticidade, dor, bexiga neurogênica entre outros. A dificuldade no desenvolvi-

mento de protocolos de tratamento da HAM/TSP ocorre também porque a maioria dos pacientes são provenientes de países em desenvolvimento, devido o longo período de latência, evolução insidiosa da doença e ao custo elevado dos estudos.

Estudos com drogas apresentam respostas limitadas, dentre estas destaca-se o uso do ácido valproico, um inibidor da lisina desacetilase que modula a condensação da cromatina e altera o padrão de expressão gênica, modulando a carga proviral e aumentando a apoptose nas células infectadas⁽⁵⁸⁾. O Fucoïdan, um polissacárideo sulfatado complexo, derivado de algas marinhas, induzindo a redução da carga proviral nos indivíduos com HAM/TSP⁽⁵⁹⁾. Estudos *in vitro* com produtos naturais como Fisalina F (extrato bruto de folhas de *Witheringia solanace*) também tem sido estudado devido suas propriedades de inibição da via NF-κB e de produção de mediadores anti-inflamatórios *in vitro*⁽⁶⁰⁾. Estudos prévios com compostos quinolínicos que foram capazes de inibir em mais de 80% da proliferação espontânea *in vitro* dos linfócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1⁽⁶¹⁾. A alta carga proviral está relacionada com piora dos sintomas associados ao HAM/TSP⁽⁶²⁻⁶⁵⁾. Diante do cenário de poucas drogas com respostas ainda limitadas, estudos são necessários com novas drogas para elucidar os mecanismos de fármacos que atuem na inibição de proliferação de linfócitos induzidos pelo vírus, reduzindo a resposta inflamatória e os sintomas associados.

2.7 Hidrazonas e seus derivados

As hidrazonas são uma classe especial de compostos orgânicos sintéticos que exibem uma ampla variedade de efeitos biológicos, dentre eles, destaca-se a atividade anti-inflamatória⁽⁶⁶⁾. Deste modo, constituem um composto versátil, com estrutura básica (Figura 1), na qual os centros ativos, carbono e nitrogênio, são os principais responsáveis pelas propriedades físicas e químicas das hidrazonas e, devido à reatividade eletrofílica e nucleofílica, as hidrazonas são usadas para a síntese de compostos orgânicos, como compostos heterocíclicos⁽⁶⁷⁾.

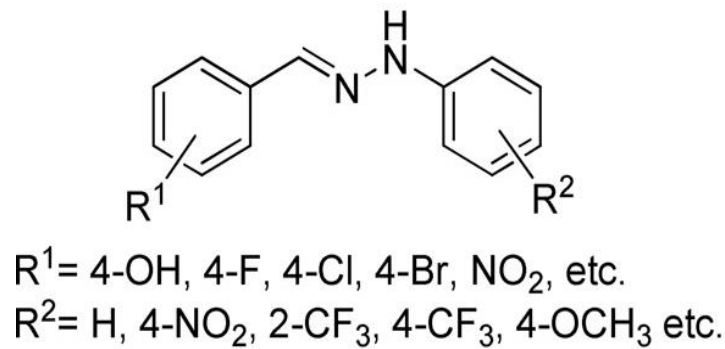


Figura 1 - Estrutura geral de hidrazonas

Fonte: Adaptado de TÖRÖK et al., *Bioquímica*, 2013 ⁽⁶⁸⁾.

A formação de uma hidrazona passa pela condensação quimiosseletiva de aldeídos ou cetonas com hidrazinas, seguida por eliminação de uma molécula de água. Quando essa hidrazina é uma hidrazida o composto formado é uma acilhidrazona (Figura 2)⁽⁶⁹⁾.



Figura 2 - Reação geral de formação de uma hidrazona (1) e reação geral de formação de uma acilhidrazona (2)

Fonte: Adaptado de Santos, *Instituto de Tecnologia em Fármacos*, 2017.

A NAH é uma estrutura modelo para derivação de múltiplas drogas, caracterizada por apresentar uma estrutura do tipo $\text{R}_1\text{R}_2\text{C=NNHCOR}^{(70)}$. É considerada uma estrutura privilegiada por ser a unidade base para a concepção de novos compostos analgésicos e anti-inflamatórios. Um exemplo dessa atuação é que a subunidade NAH é um farmacóforo chave para ligação e inibição de cicloxigenase (COX)⁽⁷¹⁾. Essa inibição está associada com o alívio da dor e inflamação⁽⁷²⁾, demonstrando potencial anti-inflamatório dessa molécula. Dois mecanismos principais foram propostos para explicar como ocorre o reconhecimento pela COX: o primeiro mecanismo envolve a acidez relativa da fração hidrogênio amida em NAH; o segundo mecanismo envolve a capacidade da estrutura de estabilizar os radicais livres que estão

estruturalmente relacionados com hidrogênio do grupo fenil em ácidos graxos, como o ácido araquidônico⁽⁷³⁾.

Nos últimos anos, há muitos relatos na literatura sobre a síntese dos derivados de hidrazona, tendo em vista que esses compostos possuem propriedades biológicas e farmacológicas diversas⁽⁷⁴⁾. Lacerda e colaboradores⁽⁷⁵⁾ descreveram o desenho e síntese de novos derivados de NAH, mostrando que essas moléculas possuem efeitos inibitórios na produção de TNF- α , tanto *in vitro* como *in vivo*. No mesmo estudo, foi observado a inibição dos níveis *in vivo* de IL-1 β e IFN- γ , indicando que esses compostos podem atuar como bloqueadores da cascata de fatores de transcrição responsáveis pela sinalização da biossíntese dessas citocinas pró-inflamatórias, além de possuírem uma baixa citotoxicidade. Os derivados de NAH apresentam efeitos que variam desde analgésicos, anti-inflamatórios, antiplaquetários, antitumoral, antiviral e atividades vasoativas⁽⁷⁵⁾. O composto LASSBio-294 foi desenvolvido como uma possível droga para o tratamento da insuficiência cardíaca, uma vez que este demonstrou atividade inotrópica positiva e moderada vasodilatação em vários modelos *in vitro* e *in vivo*. O LASSBio-1735 mostrou perfil anticâncer em linhagem de células de leucemia promielocítica. O LASSBio-897 e o LASSBio-1289 apresentam atividade vasodilatadora^(76, 77). O LASSBio 1524 inibe a Kappa Beta Kinase que ativa a via fator nuclear Kappa B (NF-KB). LASSBio 1760, 1763 e 1764 apresentam potencial anti-inflamatório atuando através da inibição de TNF-alfa, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio⁽¹⁰⁾; também há alguns derivados com ação antiparasitária⁽¹¹⁾ e dentre outros derivados o LASSBio-1386.

O LASSBio-1386 é um derivado NAH metilado [(E) -N'- (3,4-dimetoxibenzilideno) -4-metoxibenzo-hidrazida (LASSBio-1386)], sintetizado pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. Ele atua modulando a resistência vascular pulmonar causando sua diminuição, reduz a pressão do ventrículo direito estabilizando a hipertensão pulmonar e reduz a disfunção endotelial⁽¹²⁾. Um estudo recente avaliou o seu efeito também em macrófagos e em culturas de esplenócitos de camundongos *in vitro* na qual a sua adição em concentrações não tóxicas (0,5, 1 e 2 μ M) diminuiu a linfoproliferação, os níveis de IFN- γ , a produção de IL-2 e induziu o ciclo celular a permanecer na fase G0/G1⁽¹⁴⁾.

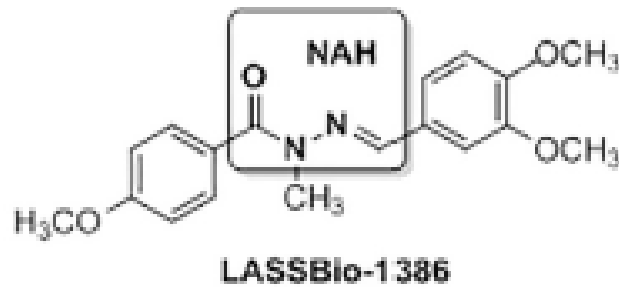


Figura 3 - LASSBio-1386

Fonte: Adaptado de Guimarães et al. 2018

O estudo de Guimarães e colaboradores⁽¹⁴⁾ foi o primeiro estudo que demonstrou a atividade imunomoduladora do composto LASSBio-1386, atividade imunossupressora e de inibição da proliferação de linfócitos, diminuindo a produção de citocinas envolvidas na proliferação e ativação de linfócitos, como IL-2, IFN γ , reduzindo os níveis de PDE-4 e de TNF-alfa e modulando a secreção de citocinas pro-inflamatórias, com o potencial de ser uma droga promissora útil no tratamento de doenças inflamatórias e imunomediadas.

Os avanços nos estudos farmacológicos para a elucidação dos mecanismos pelos quais os derivados de hidrazonas e acilhidrazonas modulam o sistema inflamatório ainda precisam ser alcançados, no entanto, eles já demonstram ser bons candidatos a fármacos anti-inflamatórios no tratamento de doenças inflamatórias crônicas. Como sabemos as concentrações elevadas de citocinas pro-inflamatórias como IL-2, TNF-alfa, IFN- γ , IL-6, IL-10 e IL-15, entre outras, têm sido relatadas tanto em pacientes com HAM/TSP, quanto em indivíduos assintomáticos. Neste contexto com a ação anti-inflamatória e antiproliferativa o LASSBio-1386 em indivíduos portadores de HTLV-1 sintomáticos pode ser uma droga promissora, uma vez que há até o momento poucas terapias disponíveis efetivas e a maioria com efeitos adversos importantes, como é visto por exemplo com o uso de corticosteróides e imunossupressores.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Determinar o efeito do composto LASSBio-1386, em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (HAM/TSP e Assintomático).

3.2 Específicos

1. Determinar a IC50 (concentração que é necessária para 50% de inibição *in vitro*) do composto LASSBio-1386
2. Avaliar o efeito antiproliferativo do composto LASSBio-1386 em linfócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1.
3. Avaliar o efeito do composto LASSBio-1386 sobre o ciclo celular e apoptose em linfócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1.
4. Quantificar a carga proviral do HTLV-1 em linfócitos tratados com o composto LASSBio-1386.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo experimental realizado com o intuito de avaliar o efeito inibitório do composto LASSBio-1386 na PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

4.2 Seleção da população

Foram selecionados 6 indivíduos não infectados pelo HTLV-1, 7 indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diagnóstico de HAM/TSP e 5 indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos, maiores de 18 anos, atendidos no Centro de HTLV da EBMSP situada na cidade de Salvador, BA, sendo uma população composta tanto de homens quanto de mulheres.

4.2.1 Critérios de inclusão

Indivíduos portadores de HTLV-1 assintomáticos e com HAM/TSP que foram diagnosticados segundo os critérios da avaliação neurológica para diagnóstico do HAM/TSP da Organização Mundial da Saúde, que aceitaram participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.2.2 Critérios de exclusão

Indivíduos com o diagnóstico de HAM/TSP comprovado, que estavam fazendo uso de medicamentos imunomoduladores ou corticoesteróides, portadores de sorologias positivas para outras infecções (Hepatites, HIV).

4.3 Considerações éticas

O presente estudo, em consonância com a resolução n° 466, de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, que incorpora, sob a ótica do indivíduo e das coletividades, referenciais da bioética, tais como, autonomia, não maleficência, beneficência, justiça e equidade, dentre outros, e visa a assegurar os direitos e deveres que dizem respeito aos participantes do estudo, à comunidade científica e ao Estado, comprometeu-se a respeitar os princípios éticos estabelecidos, bem como os limites determinados, buscando única e exclusivamente atra-

vés da produção científica avaliar o efeito inibitório do composto LASSBio-1386 na proliferação de células de indivíduos infectados pelo HTLV-1. O estudo iniciou apenas após a apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ - CAAE: 19243713.0.0000.0040). Após a aprovação, a autorização da participação do paciente se deu via assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todos os pacientes serão informados sobre os riscos e benefícios da pesquisa. Foram garantidos o sigilo e a possibilidade de se retirar do estudo a qualquer momento. A identidade dos participantes foi preservada.

4.4 Coleta de sangue dos indivíduos avaliados, obtenção de linfoblastos e cultura celular

Foram coletados 10 mL de sangue total em tubos de coleta contendo o anticoagulante heparina. Após a coleta, as PBMC foram obtidas por gradiente de Ficoll (GE Healthcare). Para isso, o sangue foi diluído em duas partes de PBS 1x (estéril), homogeneizado cuidadosamente e depois transferido delicadamente para um tubo Falcon contendo 1/3 do volume do sangue diluído em PBS 1x de Ficoll. O sangue diluído foi centrifugado por 28 minutos a 1800 rpm. Ao final do ciclo de centrifugação, o anel leucocitário foi coletado e as células foram lavadas por três vezes com PBS 1x. Para obtenção de linfoblastos nos experimentos controles, PBMC de indivíduos não infectados pelo HTLV-1 foram cultivados na presença de fitohemaglutinina (PHA) em meio RPMI 1640 e suplementadas com 1 ui/ml de IL-2 no terceiro dia. As PBMC dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 e linfoblastos de indivíduos controles foram cultivados em meio RPMI 1640, suplementado com 2mM glutamina (Sigma), 100µg/ml penicilina (Sigma), 100µg/ml estreptomicina (Sigma) e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Hyclone, Logan Utah) em placa de 96 poços na presença e ausência de LASSBio-1386 nas concentrações (0,5, 1 e 2µM) em estufa com 5% de CO₂ a 37°C durante 48 horas.

4.5 Determinação do IC₅₀ (concentração inibitória de 50%)

A IC₅₀ é a concentração necessária do composto para inibir 50% da proliferação *in vitro*. Para determinar o IC₅₀ de LASSBio-1386, os linfoblastos controles e as PBMC dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram incubados na presença de concentrações seriadas do composto (1,56; 3,125; 6,25; 12 e 25 µM /ml) em quadruplicata em placa de 96 poços, a 37°C e com 5% de CO₂. Após 48h de cultura, as células foram incubadas com 1 µCi de timi-

dina tritiada por 18h, e medida com líquido de cintilação em contador de radiação beta (β -matrix 9600, Packard). Os resultados foram apresentados em contagem por minuto (cpm).

Utilizamos como controles positivos de citotoxicidade e imunomodulação os compostos Violeta de genciana e Dexametasona na concentração de 0 a 25 $\mu\text{M}/\text{ml}$.

4.6 Inibição de Proliferação Celular

Baseado no valor da IC₅₀ de 1 μM , utilizamos metade (0,5 μM) e o dobro (2 μM) do seu valor como referência para as concentrações utilizadas no experimento de inibição de proliferação celular. Os linfócitos dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 (assintomáticos e com HAM/ TSP) foram cultivados na presença do composto LASSBio-1386 (0,5 μM , 1 μM e 2 μM) por 48 horas, com adição de 1 μCi de Timidina tritiada nas últimas 18 horas de cultura. Dexametasona (1 μM) e Violeta Genciana (1 μM) foram utilizados como controles. Após esse período, a placa de cultura foi armazenada a -80°C até o momento da contagem no leitor.

4.7 Ciclo Celular

PBMCs de indivíduos infectados (assintomático e com HAM/TSP) e não infectados pelo HTLV-1 foram cultivadas em meio RPMI em tubo FACS, na presença e na ausência de LASSBio-1386 (0,5 μM , 1 μM e 2 μM) por 48h a 37°C com 5% de CO_2 em estufa. Posteriormente, as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com solução PBS-1x (tampão fosfato-salino) e incubadas em uma solução de PBS 1x- 0,1 % de triton X-100 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de iodeto de propídeo, na ausência de luz por 30 minutos a 37°C . As células foram adquiridas em citômetro de fluxo FACS Fortessa (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA) e analisadas através do software FlowJo (Treestar, Oregon, USA).

4.8 Apoptose e Necrose

PBMCs de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (assintomáticos e com HAM/TSP) foram cultivadas em meio RPMI em tubo FACS, na presença e na ausência de LASSBio-1386 (0,5 μM , 1 μM e 2 μM) por 48h a 37°C com 5% de CO_2 em estufa. Após o tempo de incubação as células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com solução de PBS 1x e incubadas em 100 μl da solução tampão 1x e 5 μl de anexina V-FITC e de iodeto de propídeo, na ausência de luz por 15 minutos em temperatura ambiente. As células foram adquiridas em citômetro de

fluxo FACS Fortessa (Becton Dickinson 15 Biosciences, San José, CA) e analisadas através do software FlowJo (Treestar, Oregon, USA).

4.9 Quantificação da carga proviral do HTLV-1

O DNA das amostras provenientes dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 foi extraído utilizando o Kit de extração (QIAGEN). A carga proviral do HTLV-1 foi mensurada por reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real, através do sistema TaqMan da Applied Biosystems Brasil, como descrito em DEHEE e colaboradores, 2002. Foram utilizados os primers SK110/SK111 para amplificar um fragmento de 186 pb da região *pol*. A sonda TaqMan (5' FAM and 3' TAMRA) utilizada para a sequência de referência do HTLV-1 (HTLVATK), localizada no fragmento 4829-4858 pb. O DNA da albumina foi quantificado em paralelo como controle interno. A quantidade de provírus foi calculada utilizando a seguinte fórmula: CPV= número de cópias do HTLV-1 (gene *pol*) x 10⁶/número de cópias de albumina/2.

4.9.1 Análises dos dados

As variáveis foram descritas como porcentagem, médias e desvio padrão. Os programas Graphpad Prism e Flowjo foram utilizados para as análises. A proliferação celular foi calculada considerando a média da quadruplicata das cpm. O valor da IC50 foi determinada com base na porcentagem de inibição da proliferação celular e seu cálculo foi efetuado utilizando-se regressão não-linear no programa Graphpad Prism versão 5.01.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação da IC₅₀ (Concentração inibitória de 50%) de LASSBio-1386 em PBMC de indivíduos não-infectados pelo HTLV-1

Inicialmente, foram testadas concentrações seriadas do composto LASSBio-1386 (1,5 a 25 µM) para determinar a concentração inibitória do composto que reduz a proliferação celular em 50% (IC₅₀) *in vitro* utilizando linfoblastos de 4 indivíduos saudáveis não-infectados pelo HTLV-1. Para determinar o IC₅₀ foi realizado um novo experimento em linfoblastos de um indivíduo não-infectado pelo HTLV-1 com diluições menores, nas concentrações do composto LASSBio-1386 de 0,15 a 10 µM e utilizada a Dexametasona (10 µM) como controle positivo. Após esse novo experimento a IC₅₀ foi determinada em 1 µM. A Dexametasona (25 µM) foi utilizada como controle interno positivo. A concentração de 6,25µM do composto foi capaz de inibir a proliferação de linfoblastos em torno de 50%.

5.2 Inibição da proliferação celular em indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos e com HAM/ TSP

Foram realizados os experimentos para avaliar a inibição de proliferação com a concentração de LASSBio-1386 de (0,5 uM, 1uM e 2uM) em PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV-1 assintomáticos (n=4) e com HAM/ TSP (n=5).

A porcentagem de inibição da proliferação celular de linfócitos de indivíduos com HAM/TSP aumentou de acordo com o aumento da concentração de LASSBio-1386 utilizada sendo a inibição observada na concentração de 1 uM de 71,6%. A porcentagem de inibição da proliferação linfocitária de indivíduos assintomáticos apresentou maior variabilidade nas diferentes concentrações de LASSBio-1386, apresentando maior inibição de proliferação com 1 uM do composto que foi de 32% (Figura 4).

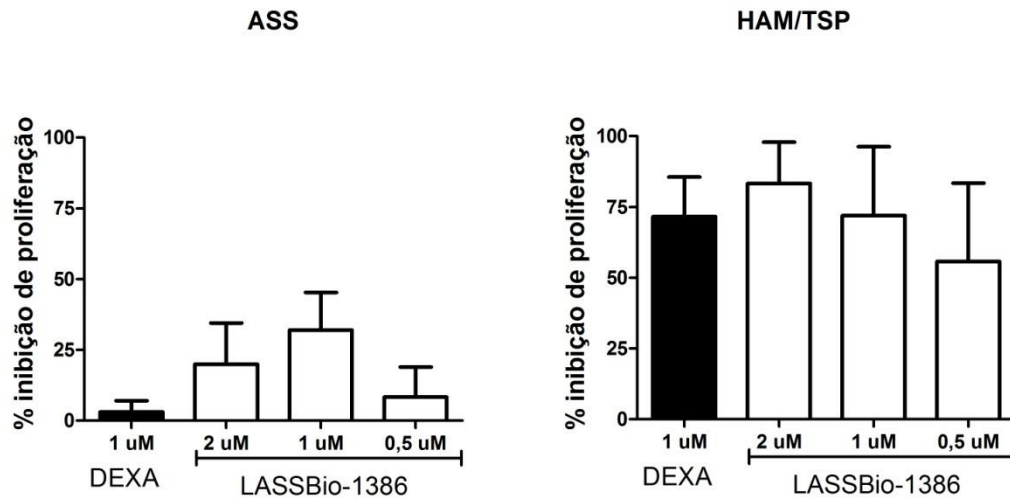


Figura 4 - Porcentagem de inibição de proliferação de linfócitos. Experimentos realizados em células de indivíduos HTLV-1 assintomáticos (n= 4) ASS e HAM-TSP (n=5) na presença de LASSBio-1386 (0,5, 1 e 2uM) e DEXA = dexametasona. Grupo ASS – 0,5uM, 1uM, 2uM (8,3%, 32%, 20%) e Grupo HAM/TSP – 0,5uM, 1uM, 2uM (72%, 83,4%, 83,4%,).

5.3 Análise do ciclo celular dos indivíduos HTLV-1 e Assintomáticos e HAM/TSP

Foi observada uma maior frequência de células na fase do G1 do ciclo celular em todos os grupos de indivíduos nas diferentes concentrações de LASSBio-1386 (Figura 5).

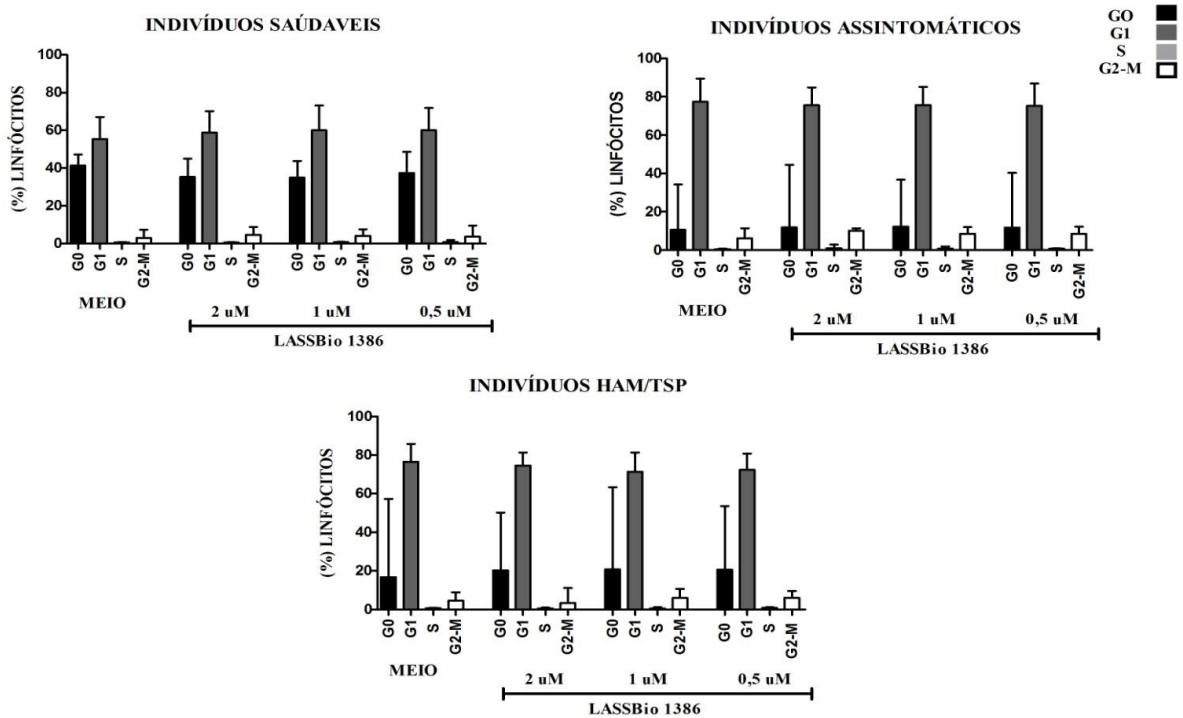


Figura 5 - Efeito do LASSBio-1386 sobre o ciclo celular. Os experimentos foram realizados com células de saudáveis (indivíduos não infectados) (n= 6), HTLV-1 ASS (n=5) e com HAM/TSP (n= 4). Valores representam porcentagem de linfócitos nas fases do ciclo celular G1/G0/ S/ G2-M na presença de LASSBio-1386 nas diferentes concentrações (0,5; 1 e 2 uM) e no meio (controle).

No grupo de indivíduos não infectados a porcentagem de linfócitos em G1 no experimento controle foi de 60,6% e com LASSBio-1386 2uM (59,7%), 1uM (61,3%) e 0,5uM (64,4%) No grupo de assintomáticos em G1 foram no experimento controle (76,3%), e com LASSBio-1386 2uM (69,1%), 1uM (71,3%), e 2uM (76%). Com HAM/TSP em G1 no experimento controle (69.6%), e com LASSBio-1386 2uM (69,5%), 1uM (64,2%), e 0,5uM (67%). Nos experimentos realizados com linfócitos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 há uma menor frequência de células na fase do ciclo celular G0 e aumento na fase G1 e G2-M (Tabela 1).

Tabela 1 - Ciclo celular. Valores representam a média e o desvio padrão para indivíduos não infectados (n=6), HTLV-1 assintomáticos (n=5) e com HAM/TSP (n=4) nas fases do ciclo celular G1/G0/S/G2-M na presença de LASSBio-1386 nas diferentes concentrações (0,5, 1 e 2uM) e no meio (controle).

| Ciclo Celular | | | | | |
|--|-----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------|-----------------|
| | FASES DO CICLO | Linfocitos (%) | | | |
| | | Meio | LASSBio-1386 | | |
| | | | 0,5 uM | 1,0 uM | 2 uM |
| INDIVÍDUOS NÃO-INFECTADOS (n=6) | G0 | 34,8 (±10,3) | 34,6 (±11,4) | 33,5 (±10) | 34,9 (±9,4) |
| | G1 | 60,6 (±8,6) | 64,4 (±15,2) | 61,3 (±8,9) | 59,7 (±8,4) |
| | S | 0,8 (±0,5) | 0,7 (±0,2) | 0,6 (±0,2) | 0,5 (±0,1) |
| | G2- M | 3,7 (±2,1) | 4,5 (±3,3) | 4,4 (±2,6) | 4,7 (±3) |
| HAM/TSP (n=4) | G0 | 24,7 (±22,9) | 26 (±20) | 28,6 (±24,4) | 24,7 (±18,4) |
| | G1 | 69,6 (±20,9) | 67 (±17,6) | 64,2 (±22,2) | 69,5 (±15,6) |
| | S | 0,6 (±0,2) | 0,77 (±0,3) | 0,6 (±0,4) | 0,6 (±0,5) |
| | G2- M | 5,1 (±2,7) | 6,25 (±2,7) | 6,3 (±3,6) | 4,9 (±4,2) |
| ASSINTOMÁTICOS (n=5) | G0 | 14,8 (±13,2) | 19,0 (±14,6) | 18,5 (±12,9) | 19,9 (±16) |
| | G1 | 76,3 (±12,3) | 76,0 (±9,6) | 71,3 (±13,6) | 69,1 (±16) |
| | S | 0,5 (±0,1) | 0,8 (±0,2) | 1,2 (±0,5) | 1,2 (±0,9) |
| | G2- M | 7,9 (±2,8) | 8,7 (±2,4) | 9,0 (±2,2) | 9,6 (±1,8) |

5.4 Apoptose e Necrose

O grupo de indivíduos com HTLV-1 assintomáticos apresentou a porcentagem de PBMC em apoptose e necrose respectivamente para o controle (9,1%) e LASSBio-1386 com 0,5uM (8,9%); 1uM (8,8%) e 2uM (8,1%). O grupo de indivíduos com HAM/TSP apresentou a porcentagem de PBMC em apoptose e necrose respectivamente para controle (10,8%), e LASSBio 1386 com 0,5uM (8%); 1uM (7,7%, 0,3%) e 2uM (6,5%).

Quanto a porcentagem de PBMC na presença e ausência do composto, não houve diferença significativa quanto aos resultados de experimentos de apoptose e necrose (Figura 6).

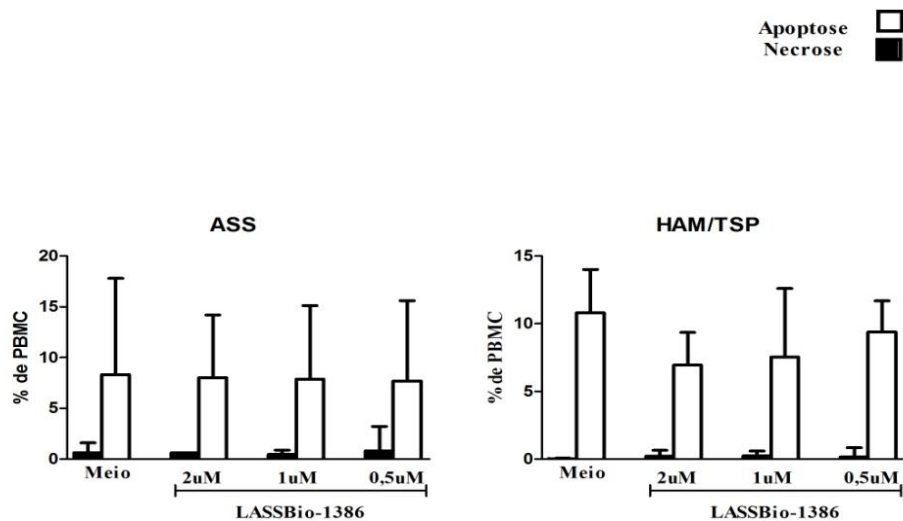


Figura 6 - Porcentagem de PBMC em apoptose e necrose. Experimentos realizados na presença de LASSBio-1386 e na ausência do composto (Meio). Indivíduos assintomáticos (n=4) e com HAM/TSP (n=5).

5.5 Carga proviral

A carga proviral foi analisada em indivíduos assintomáticos e indivíduos com HAM/TSP na ausência e na presença de LASSBio-1386 nas concentrações de 1uM. Houve redução da carga proviral nas células dos indivíduos com HAM/TSP de 67% e nas células dos indivíduos HTLV-1 assintomáticos de 43,4% na presença do composto (Figura 7).

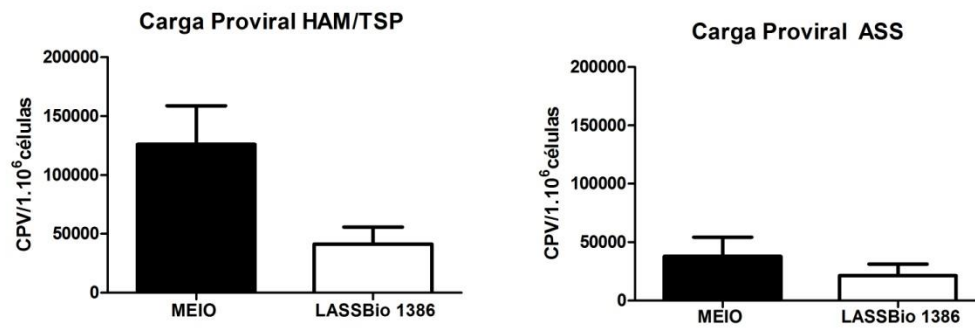


Figura 7 - Carga proviral. Experimentos realizados na presença de LASSBio-1386(1uM) e na ausência do composto (meio). Indivíduos assintomáticos (n=5) e com HAM/TSP (n=7). CPV= carga proviral. HAM= HAM/TSP, ASS= assintomático

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou o efeito do composto LASSBio-1386, derivado da NH, sobre a inibição da proliferação linfocitária *in vitro* e redução da carga proviral em células de indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Neste estudo ocorreu maior inibição de proliferação de linfócitos nos pacientes com HAM/TSP quando comparado com os indivíduos com HTLV-1 assintomáticos. As células de indivíduos com HAM/TSP apresentam maior intensidade de proliferação espontânea de linfócitos quando comparado indivíduos com HTLV-1 assintomáticos⁽⁷⁷⁾. Esta maior taxa de proliferação espontânea de linfócitos pode justificar a presença de uma maior inibição de proliferação de linfócitos encontrada nos experimentos realizados nas células dos indivíduos com HAM/TSP. O estudo prévio de Guimarães e colaboradores⁽¹⁴⁾ demonstrou que com baixas doses de LASSBio-1386, inclusive utilizando a mesma concentração que realizamos neste estudo (0,5, 1 e 2 μM), houve inibição da proliferação celular de esplenócitos de camundongos *in vitro*. A proliferação espontânea dos linfócitos provocada pela infecção do HTLV-1 contribui significante com a patogênese da HAM/TSP, quanto maior proliferação espontânea, maior a destruição da medula espinhal podendo levar a sintomas associados como perda de funcionamento dos membros inferiores e imobilidade. A inibição da proliferação espontânea pode retardar a progressão da doença e pode diminuir a sintomatologia ligada à HAM/TSP.

A carga proviral apresentou importante redução na presença do composto nos indivíduos portadores de HTLV-1, com maior expressão de redução no grupo com HAM/TSP quando comparado ao grupo de HTLV-1 assintomáticos. Há vários mecanismos de ação de drogas previamente estudadas para o tratamento da doença sintomática nos portadores de HTLV-1. Podemos destacar a atividade imunomoduladora e antiproliferativa que ocorre com o uso de ácido ascórbico em altas doses, o controle de ciclo celular induzindo apoptose de células infectadas e supressão de genes do HTLV-1 que foi descrito com uso do Interferon combinado com a Zidovudina⁽⁴⁹⁾; a modulação da carga proviral⁽⁶²⁾ descrita com ácido valpróico. A carga proviral é maior em pacientes HAM / TSP do que em portadores de HTLV-1 assintomáticos e a proliferação oligoclonal é maior no HAM / TSP podendo justificar desta forma uma maior ação inibitória de LASSBio-1386 nas células de indivíduos com HAM/TSP quando comparado com células de indivíduos portadores de HTLV-1 assintomáticos. A redução da proliferação linfocitária contribui no controle da carga proviral e a redução da carga proviral pode contribuir para a redução da patogênese da doença inflamatória⁽⁷⁷⁾. A ação antiviral de derivados NAH foi demonstrada também em estudos prévios onde foram evidencia-

dos a ação antiviral sobre o vírus da imunodeficiência humana, inibindo a atividade da ribonucleotido redutase, outros derivados NAH também possuem atividade antiviral sobre os vírus da hepatite A e Herpes simplex virus-1⁽⁷⁵⁾.

No estudo de Guimarães et al, quanto ao ciclo celular, o LASSBio-1386 demonstrou atuar modulando a secreção de citocinas como IL-2 e Interferon- γ em esplenócitos e macrófagos *in vitro*, induzindo o ciclo celular a permanecer em G0/G1 nas concentrações (0,5, 1 e 2 μM)⁽¹⁴⁾, fato que não foi observado em nossos experimentos. Há outros mecanismos que podem estar associados com a proliferação celular e que ainda não foram estudados com o composto LASSBio-1386 como a expressão de proteínas reguladoras como TAX, HBZ, proteínas acessórias (p12 e p30) e a inibição de citocinas como IL-6, TNF-alfa, IL-10. Importante ressaltar que quanto ao ciclo celular há ausência de dados na literatura sobre a atuação do LASSBio-1386 nas células dos indivíduos com HTLV-1.

Em relação a apoptose e necrose não foram observadas diferenças nos experimentos realizados na presença e ausência do composto nas células dos indivíduos portadores de HTLV-1 ou HAM/TSP.

O LASSBio-1386 com sua ação anti-proliferativa e antiviral, demonstrou que pode ser uma droga promissora a ser estudada no contexto do tratamento dos indivíduos sintomáticos infectados pelo HTLV-1.

7 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS DO ESTUDO

As principais limitações encontradas neste estudo foram: o número reduzido de indivíduos avaliados. A grande variação no tipo celular utilizado nos nossos experimentos em comparação ao tipo celular estudado previamente por Guimarães e colaboradores⁽¹⁴⁾, podendo justificar a variabilidade dos resultados nos experimentos realizados com células de humanos *in vitro*.

As perspectivas deste estudo são realizar a dosagem de citocinas como IL-2, IL-10, IL-15 e TNF- alfa na presença do composto para determinar o efeito de LASSBio-1386 na produção destas citocinas nas células dos indivíduos com HTLV-1. Aumentar o número de experimentos para avaliação do ciclo celular em células de indivíduos com HAM/TSP visando entender melhor o mecanismo de inibição de proliferação linfocitária e de redução da carga proviral que ocorre na presença de LASSBio-1386.

8 CONCLUSÃO

O LASSBio-1386 tem efeito antiproliferativo sobre os linfócitos de células infectadas pelo HTLV-1 e promove a redução da carga proviral.

REFERÊNCIAS

1. Gallo RC. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*. 2005; v. 2. n. 17.
2. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol*. 3: 388 doi: 10.3389/fmicb.2012.00388, 2012.
3. Dourado I, Acantara LC, et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003; v. 34, n. 5, p. 527-31.
4. Cook LB, Elemans M, Aileen GR, Asquith B. HTLV-1: Persistence and pathogenesis. *Virology*. 2013; 435:131– 140.
5. Carvalho EM, et al. Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T lymphotropic virus type 1-infected blood donors. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 27(1):1–6, 2001.
6. Cook LB, et al. HTLV-1: persistence and pathogenesis. *Virology*. Elsevier; 435(1):131–40, 2013.
7. Waclawik AJ, Fadic R, Lotz BP, Beinlich BR, Lewandoski PJ, Sanjak M, et al. CD8 and CD4 T cell-mediated polymyositis complicating the HTLV-1 associated myelopathy. Quantitative evaluation of corticosteroid treatment. *Acta neurologica Scandinavica*. [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1996 Aug;94(2):115-9.
8. Rafatpanah H, Rezaee A, Etemadi MM, Hosseini RF, Khorram B, Afsahr L, et al. The impact of interferon-alpha treatment on clinical and immunovirological aspects of HTLV-1-associated myelopathy in northeast of Iran. *Journal of neuroimmunology*. [Clinical Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Sep 15;250(1-2):87-93.
9. Kaplancikli ZA, Altintop MD, Ozdemir A, Turan-Zitouni G, Khan SI, Tabanca N. Synthesis and biological evaluation of some hydrazone derivatives as anti-inflammatory agents. *Lett. Drug Des. Discov*. 2012 ; (9) : 310–315.
10. Hernández P, Cabrera M, Lavaggi ML, Celano L, Tiscornia I, Rodrigues da Costa T, Thomson L, Bollati-Fogolín M, Miranda AL, Lima LM, Barreiro EJ, González M, Cerecetto H. Discovery of new orally effective analgesic and anti-inflammatory hybrid furxanyln N-acylhydrazone derivatives. *Bioorg Med Chem*. 2012 ; 20(6):2158-71.
11. Cordeiro NM, Freitas RH, Fraga CA, Fernandes PD. Discovery of novel orally active tetrahydro-naphthyl-N-acylhydrazones with in vivo anti-TNF- α effect and remarkable anti-inflammatory properties. *PLoS One* 11 e0156271, 2016.
12. Carvalho SA, Kaiser M, Brun R, da Silva EF, Fraga CA. Antiprotozoal activity of (E)-cinnamic N-acylhydrazone derivatives, *Molecules*. 2014; (19):20374–2038.

13. Alencar AK, Pereira SL, Da Silva FE, Mendes LV, Cunha VM, Lima LM, et al. Zapata-Sudo, N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity. *Int. J. Cardiol.* 2014; 173: 154–162.
14. Guimarães ET, Santos TB, Silva DKC, Meira CS, Moreira DRM, Da Silva TF, Salmond D, Barreiro EJ, Soares MBP. Potent immunosuppressive activity of a phosphodiesterase-4 inhibitor Nacylhydrazone in models of lipopolysaccharide-induced shock and delayed type hypersensitivity reaction. *International Immunopharmacology.* 2018; 65:108–118.
15. Kohtz DS, Altman A, Kohtz JD, Puszki S. Immunological and structural homology between human T-cell leukemia virus type I envelope glycoprotein and a region of human interleukin-2 implicated in binding the fl receptor. *Journal of Virology.* 1988; 62: 659-662.
16. 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): 7415–7419.
17. Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of Human Adult T-cell Leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 1982; (79): 2031-2035.
18. Kalyanaram VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science.* Nov 5. 1982; 218(4572):571–573.
19. Roucoux DF, Murphy EL. The epidemiology and disease outcomes of human Tlymphotropic virus type II. *AIDS Reviews.* 2004; v. 6, n. 3, p. 144–154.
20. Calattini S, et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology.* 2005; (1): 30.
21. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 22: 7994–7999.
22. Delamarre L, Rosemberg AR, Pique C, Pham D, Callebauti, Dokh elar MC. The HTLV-1 envelope glycoproteins: structure and functions. *J. Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996; 13:(1 SUPPL.): 85-91.
23. Felix JK, Garrido NMEN, Sitbon CVM, Battini Jean-Luc. HTLV-1 and -2 envelope SU subdomains and critical determinants in receptor binding. *Retrovirology.* 2004; v. 1. n 41. p 1-14.
24. Sagara Y, Inoque Noue Y, Shiraki H, Jinno A, Hoshino H, Maeda Y. Identification and Mapping of Functional Domains on Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Envelope Proteins by Using Synthetic Peptides. *J of Virol.* 1996. 70 (3), 1564-1569.

25. Lamb D, Schüttelkopf AW, Aalten D, Bright DW. Highly specific inhibition of leukaemia virus membrane fusion by interaction of peptide antagonists with a conserved region of the coiled coil of envelope. *Retrovirology*. 2008; 5: 70.
26. Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. The Ubiquitous Glucose Transporter GLUT-1 is a Receptor for HTLV. *Cell*. 2003; 115: 449-459.
27. Giam CZ, Semmes OJ. HTLV-1 infection and adult T-cell leukemia/lymphoma—a tale of two proteins: Tax and HBZ. *Viruses*, v. 8, n. 6, p. 161, 2016.
28. Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, Matsuoka M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 17;103(3):720-5.
29. Azran I, Schavinsky-Khrapunsky Y, Aboud M. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity *Retrovirology*. 2004; (1):20.
30. Shiohama Y, Naito T, Matsuzaki T, Tanaka R, Tomoyose T, Takashima H, et al. Absolute quantification of HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) protein and its plasma antibody in HTLV-1 infected individuals with different clinical status. *Retrovirology*. 2016; (13) 29: 1-14.
31. Wullaert A, Bonnet MC, Pasparakism M. NF- KB in the regulation of epithelial homeostasis and Inflammation. *Cell Res*. 2011; 21(1): 146–158.
32. Hall WW, Ishak R, Zhu SW, Novoa P, Eiraku N, Takahashi H, et al. Human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II): Epidemiology, molecular properties, and clinical features of infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 1996; 13(Supl. 1): S204-S214.
33. Caron M, Besson G, Padilla C, Makuwa M, Nkoghe D, et al. Revisiting human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 infections among rural population in Gabon, central Africa thirty years after the first analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2018; 12(10): e0006833.
34. Kramer A, Jacobson S, et al. Spontaneous lymphocyte proliferation in symptom-free HTLV-I positive Jamaicans. *Lancet*. 1989; 2(8668): 923-924.
35. Asquith B, et al. In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2007; 104(19): 8035-8040.
36. Brito-Melo GE, Martins-Filho OA, et al. Phenotypic study of peripheral blood leucocytes in HTLV-I-infected individuals from Minas Gerais, Brazil. *Scand J Immunol* (2002); 55(6): 621-628.
37. Popovic M, Flomenberg N, et al. Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-I or HTLV-II. *Science*. 1984; 226(4673): 459-462.

38. Santos SB, Porto AF, et al. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC InfectDis* 2004. 4:7.
39. Matsuoka M, Green PL. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology*. 2009; 6: 71.
40. Hinuma Y, et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1981; v. 78, n. 10, p. 6476-6480.
41. Gessain A, Barin F, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 1985; 2(8452): 407-410.
42. Mochizuki M, et al. HTLV-I and uveitis. *Lancet*. 1992; 339(8801): 1110.
43. Lagrenade L. et al. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet*. 1990; 336(8727): 1345-1347.
44. Castro-Lima Vargens C, Grassi MF, Boa-Sorte N, Rathsam-Pinheiro RH, Olavarria VN, de Almeida Kruschewsky R, Galvão-Castro B. Keratoconjunctivitis sicca of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infected individuals is associated with high levels of HTLV-1 proviral load. *J Clin Virol*. 2011; 52(3): 177-180.
45. Moreira ED, Ribeiro TT, Swanson P, Sampaio FC, Melo A, Brites C. et al. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in northeastern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1993; 6 (8):959-63.
46. Pedral - Sampaio DB, Martins Netto E, Pedrosa C, Brites C, Duarte M, Harrington W. Jr. Co-Infection of Tuberculosis and HIV/HTLV Retroviruses: Frequency and Prognosis Among Patients Admitted in a Brazilian Hospital. *Braz J Infect Dis*. 1997; 1:31-35.
47. Marinho J, Galvao-Castro B, Rodrigues LC, Barreto ML. Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case-control study. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005; 40:625-28.
48. Bastos ML, Osterbauer B, Mesquita DL, Carrera CA, Albuquerque MJ, Silva L, et al. Prevalence of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in hospitalized patients with tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2009;13:1519-23.
49. Telke – Haimanot R, Frommel D, Tadesse T, Verdier M, Abebe M, Denis F. A survey of HTLV-1 and HIVs in Ethiopian leprosy patients. *AIDS*. 1991; 5: 108-110.
50. Takeshita T, Takeshita H. Crusted (Norwegian) scabies in a patient with smoldering adult T-cell leukemia. *J Dermatol*. 2000. v.27, n.10, p.677-9.
51. Proietti FA, et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*. 2005; 24(39): 6058-6068.

52. Caskey MF, et al. Clinical manifestations associated with HTLV type I infection: a cross-sectional study. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007; 23(3): 365-371.
53. Burg G, Kempf W, Cozzio A, Feit J, Willemze R, S Jaffe E, et al. WHO/EORTC classification of cutaneous lymphomas 2005: histological and molecular aspects. *J Cutan Pathol*. 2005;32:647-74
54. Bazarbachi A, Hermine O. Treatment with a combination of zidovudine and alpha-interferon in naive and pretreated adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1996;13 Suppl 1:S186-90.
55. Matutes E, Taylor GP, Cavenagh J et al. Interferon alpha and zidovudine therapy in adult T- Cell leukaemia lymphoma: response and outcome in 15 patients. *British Journal of Haematology*, 2001; v. 113, p. 84-779.
56. Ribas JGR, Melo GCN. Mielopatia associada ao vírus linfotrópico humano de células T do tipo 1 (HTLV-1). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; 35:377-384.
57. Kinpara S, et al. Interferon- α (IFN- α) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN- α combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. *Retrovirology*. 2013; v. 20, p. 52.
58. Olindo S, et al. Safety of long-term treatment of HAM/TSP patients with valproic acid, *Blood*. 2011; v. 118, n. 24, p. 6306-6309.
59. Araya N, et al. Fucoidan therapy decreases the proviral load in patients with human T-lymphotropic virus type-1-associated neurological disease. *Antiviral Ther*. 2011. v. 16, n. 1, p. 89- 98.
60. Jacobo-Herrera NJ, et al. Physalins from *Witheringia solanacea* as modulators of the NF-kappaB cascade. *J. Nat. Prod*. 2006; v.69, n.3, p.328-331.
61. Grassi F, Guimaraes Correa AB et al. Quinoline compounds decrease in vitro spontaneous proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from human T-cell lymphotropic virus (HTLV) type-1-infected patients. *Biomed Pharmacother*. 2008; v.62, n. 7, p. 430-435.
62. Olindo S, et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. *J Neurol Sci*. 2005; 237:53-9.
63. Matsuzaki T, et al. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. *J Neurovirol*. 2001; 7: 228-34.
64. Nagail M, et al. Analysis of HTLV-1 proviral load in 202 TSP/HAM patients and 243 asymptomatic HTLV-1 carriers: high proviral load strongly predisposes to TSP/HAM. *J. Neurovirol*. 1998; 4: 586-593.

65. Gonçalves DU, et al. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) inflammatory network. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2008; Jun;7(2):98-107.
66. Bala S, et al. Hydrazones as Promising Lead with Diversity in Bioactivity-therapeutic Potential in Present Scenario. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 2013. 18(1). 65–74.
67. Kajal A, Bala S, Sharma N, Kamboj S, Saini V. Therapeutic Potential of Hydrazones as Anti-Inflammatory Agents. *International Journal of Medicinal Chemistry*. 2014; 761030:1-11.
68. Santos SB, Porto AF, et al. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. *BMC InfectDis* 2004. 4:7.
69. Török B, Sood A, Bag S, Tulsan R, et al. Diaryl Hydrazones as Multifunctional Inhibitors of Amyloid Self-Assembly. *Biochemistry*. 2013. 52 (7), 1137-1148.
70. Santos LA. Síntese de N-Acilhidrazonas baseados no fármaco isoniazida. [TCC - Especialização]. Instituto de Tecnologia em Fármacos/ Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz. 2017.
71. Duarte CD, Barreiro EJ, Fraga CAM. Privileged structures: a useful concept or the rational design of new lead drugs candidates, *Mini-Rev. Med. Chem*. 2007; 7:1108-19.
72. De Melo TRF, Chelucci RC, Pires MEL, et al. Pharmacological Evaluation and Preparation of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Containing an N-Acyl Hydrazone Subunit. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15 (4):5821-5837.
73. Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *Journal of Clinical Investigation*. 2006; 116(1):4-15.
74. Mu JX, Shi YX, Wu HK, Sun ZH, Yang MY, Liu XH, Li BJ. Microwave assisted synthesis, antifungal activity, DFT and SAR study of 1,2,4-triazolo[4,3-a]pyridine derivatives containing hydrazone moieties. *Chemistry Central Journal*. 2016; (10) 50: 1-9.
75. Lacerda RB, Sales NM, da Silva LL, et al. Novel potent imidazo[1,2-a]pyridine-N-Glyciny-hydrazone inhibitors of TNF- α production: in vitro and in vivo studies. *Plos ONE*. 2014, 9(3): e91660.
76. Rollas S, Küçükgülzel SG. Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules*. 2007; 12: 1910-1939.
77. Thota S, Rodrigues DA, Pinheiro P de SM, Lima LM, Fraga CAM, Barreiro EJ. N-Acylhydrazones as drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2018; 28(17): 2797–2806.

78. Kummerle AE, Schmitt M, Cardozo SVS, Lugnier C, Villa P, Lopes AB, Romeiro NC, et al. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of N-acylhydrazones and novel conformationally constrained compounds as selective and potent orally active phosphodiesterase-4 inhibitors. *J. Med. Chem.* 2012; 55:7525-7545.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Identificação, produção e avaliação de fármacos e proteínas recombinantes com potencial terapêutico e/ou profilático em HTLV-1, doença de Chagas e leishmanioses.

Instituição: Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, FIOCRUZ; Rua Waldemar Falcão, 121 Brotas CEP 40295-001

Pesquisador responsável:

Dra. Maria Fernanda Rios Grassi CRM 9894
Telefone: 3176 2213

Prezado(a) paciente,

Como voluntário o Sr (a) está sendo convidado a participar de uma investigação patrocinada pelo Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP) com o objetivo de avaliar a ação de novas drogas sobre a multiplicação das células do sangue em indivíduos infectados pelo vírus humano de células T (HTLV). A infecção pelo HTLV é freqüente no Brasil, particularmente em Salvador-Bahia, onde 2% da população encontra-se infectada. O estudo destas novas drogas pode contribuir para o tratamento de doenças associadas à infecção por este vírus, especialmente leucemia e linfomas, que embora raros são de extrema gravidade.

Para que seja possível realizar esta pesquisa pedimos a doação de uma amostra de sangue que permitirá estudar suas células sanguíneas. Essas amostras serão obtidas no momento em que exames de sangue forem necessários para o seu próprio acompanhamento clínico. Aproveitaremos o pedido de coleta de sangue para o exame de rotina, e solicitaremos ao laboratório que retire um pouco a mais (30 ml ou cerca de 2 colheres de sopa) para esta pesquisa. Assim sendo, o número de vezes que o sangue será retirado não será maior do que o realmente necessário para o acompanhamento de rotina e não será necessário vir ao Centro médico apenas com o objetivo de participar da pesquisa.

A coleta de sangue será realizada por um profissional treinado e não envolve muitos riscos, pode ocorrer uma dor ligeira e um pequeno sangramento no local da picada, ficando o braço roxo. Esta mancha desaparece dentro de 1 a 2 dias.

A sua participação neste estudo é voluntária e espontânea. A sua assistência médica não será modificada em função da sua aceitação ou não em participar deste estudo. Também não envolverá nenhum custo adicional. Caso necessite regressar ao hospital por razões ligadas ao estudo, suas despesas com transporte e alimentação serão pagas pelos responsáveis pela pesquisa.

Além disso, você poderá desistir de participar a qualquer momento sem que isto interfira no tratamento futuro neste hospital. O material obtido de sua amostra de sangue (plasma e células) será utilizado apenas neste estudo. Toda a informação obtida ou disponibilizada neste estudo será considerada como sigilosa de modo a garantir confidencialidade e não será divulgada sem a sua permissão.

Para que outros médicos possam no futuro ampliar seus conhecimentos sobre esta doença, gostaríamos de mostrar os resultados obtidos neste projeto em congressos (pôster ou apresentação oral) e em publicações em revistas científicas.

Por outro lado, nos comprometemos a não dizer seu nome e a utilizar os resultados obtidos apenas com finalidade científica.

A equipe de pesquisadores (Dr Bernardo Galvão, Dra Fernanda Grassi) está disponível a qualquer momento para qualquer esclarecimento no número 3176-2213.

Caso queira, o Sr (a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisas da Fio-cruz pelo telefone 3176-2285.

Os pesquisadores se comprometem a informar o CEP caso a pesquisa seja descontinuada.

Eu _____ aceito fazer parte do grupo de estudo **“Identificação, produção e avaliação de fármacos e proteínas recombinantes com potencial terapêutico e/ou profilático em HTLV-1, doença de Chagas e leishmanioses.”**

Recebi todas as orientações sobre este trabalho. Entendi o propósito do estudo, e compreendo que o objetivo deste estudo é uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na infecção causada pelo vírus HTLV-1. Sei que este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana.

Estou recebendo uma cópia deste documento datada e assinada, e não estou abdicando de nenhum dos meus direitos legais.

Salvador, ____ / ____ / _____.

Assinatura: _____

Assinatura da

Testemunha: _____

Impressão datiloscópica

ANEXOS

Anexo A – Parecer Consubstanciado de CEP

CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação, produção e avaliação de fármacos e proteínas recombinantes com potencial terapêutico e/ou profilático em HTLV-1, doença de Chagas e leishmanioses.

Pesquisador: Maria Fernanda Rios Grassi

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 19243713.0.0000.0040

Instituição Proponente: Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.011.669

Data da Relatoria: 26/02/2015

Apresentação do Projeto:

Segundo a proponente, a Organização Mundial da Saúde define doenças negligenciadas como "um conjunto de doenças associadas à situação de pobreza, às precárias condições de vida e às iniquidades em saúde". Aproximadamente um bilhão de pessoas em todo o mundo estariam expostas a estas doenças, principalmente em países em desenvolvimento (OMS, 2010). Além da escassez no conhecimento científico, uma das características mais marcantes das doenças negligenciadas é o pouco interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos fármacos ou de vacinas. Neste contexto, três endemias de importância para o Brasil, e particularmente para a Bahia, se destacam: a infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1), a doença de Chagas e as Leishmanioses. A HAM/TSP é uma

doença rara nos países industrializados, com exceção do Japão, e, portanto, atrai pouco interesse da indústria farmacêutica. Uma possível estratégia para o tratamento de pacientes infectados por HTLV-1 é o uso de drogas capazes de controlar a proliferação de linfócitos induzida pelo vírus. Nesse sentido, nosso grupo de pesquisas tem avaliado compostos com atividade na proliferação espontânea de PBMC de pacientes com HAM/TSP. Recentemente, o grupo identificou quatro novos compostos quinolínicos (BS74, MDS14, MDS22 e MHM22) capazes de inibir mais de 80% a proliferação espontânea em

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121

Bairro: Candeal

CEP: 40.296-710

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (71)3176-2327

Fax: (71)3176-2285

E-mail: cep@bahia.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA**



Continuação do Parecer: 1.011.669

PBMC de indivíduos infectados pelo HTLV (Grassi, Guimaraes Correa et al. 2008).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Triar candidatos a fármacos, selecionados de acordo com os seguintes critérios: para o HTLV-1 moléculas com potencial imunomoduladora, antiproliferativa ou anti-inflamatória, e para *T. cruzi* e leishmania, inibidores de quinases e proteases.

Objetivo Secundário:

- 2.1) Avaliar a citotoxicidade dos fármacos em células mononucleares humanas e murinas;
- 2.2) Estabelecer protocolos baseados em RPS para avaliar a ligação de fármacos às proteínas alvo do HTLV-1 (Tax, HBZ), *T. cruzi* (GSK-3, cruzaína) e *Leishmania spp* (GSK-3, DYRK);
- 2.3) Determinar o efeito dos fármacos sobre a proliferação celular induzida pelo HTLV-1 e sobre *T. cruzi* e leishmania;
- 2.4) Quantificar a carga proviral do HTLV-1 e a taxa de morte celular em células mononucleares humanas na presença dos fármacos;
- 2.5) Quantificar o efeito dos fármacos sobre a produção de quimiocinas (CXCL9 e CXCL10) e citocinas Th1, Th2 e Th17 no sobrenadantes de culturas de células mononucleares de indivíduos infectados pelo HTLV-1;
- 2.6) Determinar os efeitos dos fármacos na organização ultraestrutural das células mononucleares infectadas pelo HTLV-1 em presença dos fármacos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer nº 505.495 de 19/12/2013.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme parecer nº 505.495 de 19/12/2013.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme parecer nº 505.495 de 19/12/2013. As pendências apontadas neste parecer foram atendidas:

1. Esclarecer a origem dos buffy coats. Apresentar carta da instituição fornecedora/participante:
 - Os buffy-cots serão obtidos no HEMOBA. Apresentada carta com o ciente dos termos do trabalho e concordância do mesmo.

| | |
|---|-------------------------------------|
| Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 | CEP: 40.296-710 |
| Bairro: Candéal | |
| UF: BA | Município: SALVADOR |
| Telefone: (71)3176-2327 | Fax: (71)3176-2285 |
| | E-mail: cep@bahia.fiocruz.br |

**CENTRO DE PESQUISAS
GONÇALO MONIZ -
FIOCRUZ/BA**



Continuação do Parecer: 1.011.669

2. Apresentar carta de concordância da Instituição participante.
- A carta de anuência do HEMOBA foi anexada

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em cumprimento da Res. 466/2012 e Norma Complementar vigente, enviar relatórios semestrais a partir desta data, e relatório final em até um mês após o término da vigência do projeto conforme cronograma aprovado neste protocolo.

SALVADOR, 06 de Abril de 2015

**Assinado por:
Adriana Lanfredi Rangel
(Coordenador)**

| | | |
|---|----------------------------|-------------------------------------|
| Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 | | CEP: 40.296-710 |
| Bairro: Candeal | | |
| UF: BA | Município: SALVADOR | |
| Telefone: (71)3176-2327 | Fax: (71)3176-2285 | E-mail: cep@bahia.fiocruz.br |

Anexo B – Experimento apoptose e necrose

Figura 8. Frequência de células (linfócitos) em apoptose e necrose. Efeito do LASSBio-1386 sobre a apoptose e necrose dos linfócitos de um indivíduo infectado pelo HTLV-1 com HAM/TSP, cultivado em meio de cultura por 48 horas (controle) e na presença de LASSBio-1386 (0,5, 1 e 2 uM) por 48h. Q3= anexina, Q1- iodeto de propídeo, PI- iodeto de propídeo. FSC- tamanho relativo a célula, SSC- granulocidade.

