



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE GENES DA REGIÃO *pX* NA
LEUCEMIA/LINFOMA DE CÉLULAS T DO ADULTO (ATL) E NA DERMATITE
INFECCIOSA ASSOCIADA AO HTLV-1 (DIH)**

EVERTON DA SILVA BATISTA

**Salvador – Bahia
2015**

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

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE GENES DA REGIÃO *pX* NA
LEUCEMIA/LINFOMA DE CÉLULAS T DO ADULTO (ATL) E NA DERMATITE
INFECCIOSA ASSOCIADA AO HTLV-1 (DIH)**

EVERTON DA SILVA BATISTA

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maria Lourdes Farre Vallve

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Doutor.

**Salvador – Bahia
2015**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

B333a Batista, Everton da Silva
Avaliação quantitativa dos genes da região *pX* na Leucemia/ linfoma de células T do adulto (ATL) e na Dermatite infecciosa associada ao HTLV-1 (DIH). / Everton da Silva Batista. - 2015.
57 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof^a Dr^a Maria Lourdes Farre Vallve, Laboratório de Patologia Experimental.

Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2015.

1. HTLV-1. 2. Leucemia. 3. Genes. 4. Dermatite. I. Título.

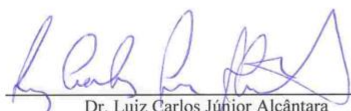
CDU 616.98:577.2

"AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE GENES DA REGIÃO PX NA LEUCEMIA/LINFOMA DE CÉLULAS T DO ADULTO (ATL) E NA DERMATITE INFECCIOSA ASSOCIADA AO HTLV-1 (DIH)".

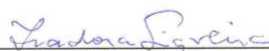
EVERTON DA SILVA BATISTA

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ



Dra. Isadora Cristina de Siqueira
Pesquisadora
CPqGM/FIOCRUZ



Dr. Pedro Dantas Oliveira
Professor Titular
FAMED/UFSE

O que eu faço é uma gota no meio do oceano. Mas sem ela, o oceano será menor.

Madre Teresa de Calcutá

FONTES DE FINANCIAMENTO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, uma força maior e essencial.

À minha família, por todo o incentivo para sempre continuar estudando e trabalhando e por toda a formação que a mim foi proporcionada.

À TODOS os meus amigos.

À minha orientadora, Dr^a. Lourdes Farré, por TUDO.

Aos colegas de grupo.

Aos colegas do LAPEX, e ao chefe do laboratório, Dr^o. Zilton Andrade.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM.

Às bibliotecárias, Ana Fiscina, Eliana Garcia, Martha Martinez e Adelvani de Araújo por todo apoio e presteza desde o período do mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, pelo incentivo através da bolsa de doutorado.

Ao Conselho de Desenvolvimento científico e tecnológico – CNPq.

Ao grupo de Manifestações infanto juvenis da infecção pelo HTLV-I na Bahia em nome da Dr^a. Achiléa Bittencourt, que através dessa colaboração tem realizado estudos extremamente relevantes em pacientes com HTLV-I no estado da Bahia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura do HTLV-1.....	15
Figura 2 Genoma do HTLV-1.....	16
Figura 3 Áreas endêmicas do HTLV-1 no mundo.....	17
Figura 4 Lesões características da DIH em região retroauricular (A) e nas narinas (B).....	22
Figura 5 Esquema representativo do mecanismo de patogêneses da DIH.....	23
Figura 6 Diversidade ações da proteína p12.....	26
Figura 7 Ações de p13 a nível mitocondrial e nuclear.....	27
Figura 8 O papel regulatório de p30 na transcrição viral.....	28
Figura 9 Níveis de expressão dos genes <i>p12</i> , <i>p13</i> e <i>p30</i> em pacientes com ATL em geral, em portadores assintomáticos e em comparação entre os grupos.....	40
Figura 10 Níveis de expressão dos genes <i>p12</i> , <i>p13</i> e <i>p30</i> nas diferentes formas clínicas da ATL e portadores assintomáticos adultos.....	41
Figura 11 Níveis de expressão dos genes <i>p12</i> (A), <i>p13</i> (B) e <i>p30</i> (C) nas diferentes formas clínicas da ATL e portadores assintomáticos adultos com os dados ajustados pela carga proviral.....	42
Figura 12 Comparação dos níveis de expressão dos genes <i>p12</i> , <i>p13</i> e <i>p30</i> em pacientes de DIH em geral, portadores assintomáticos e comparação entre os dois grupos...44	44
Figura 13 Níveis de expressão dos genes <i>p12</i> , <i>p13</i> e <i>p30</i> nos diferentes grupos da faixa infantojuvenil.....	45
Figura 14 Expressão dos mRNAs dos genes <i>HBZ</i> e <i>tax</i> em pacientes da faixa infantojuvenil com DIH e DIH com associação com HAM/TSP em dados ajustados pelo controle endógeno.....	46
Figura 15 Expressão dos mRNAs dos genes <i>HBZ</i> e <i>tax</i> em portadores assintomáticos do HTLV-1 da faixa infantojuvenil.....	47

Figura 16 Avaliação intergrupos da expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nos indivíduos da faixa infantojuvenil infectados pelo HTLV-1.....48

Figura 17 Níveis de expressão do mRNA de *p12*, *p13* e *p30* em grupos de diferentes faixas etárias e com distintas patologias associadas à infecção pelo HTLV-1...49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Oligonucleotídeos iniciadores para obtenção do fragmento do gene <i>tax</i> e do gene de referência <i>β-globina</i> , por PCR convencional, utilizados para a construção da curva padrão.....	31
Tabela 2 Oligonucleotídeos e sondas utilizados para a quantificação da carga proviral por PCR em tempo real para os genes <i>tax</i> e <i>β-globina</i>	32
Tabela 3 Oligonucleotídeos iniciadores para obtenção do fragmento dos genes virais <i>p12</i> , <i>p13</i> e <i>p30</i> e o endógeno de referência <i>HPRT</i> , por PCR convencional, utilizados para a construção da curva padrão.....	33
Tabela 4 Oligonucleotídeos iniciadores para quantificação das amostras para os genes virais <i>p12</i> , <i>p13</i> e <i>p30</i> e o endógeno de referência <i>HPRT</i>	34
Tabela 5 Oligonucleotídeos iniciadores para obtenção do fragmento dos genes <i>tax</i> , <i>HBZ</i> (<i>HBZ</i> e <i>HBZ-SI</i>) e o <i>HPRT</i> , por PCR convencional, utilizados para a construção da curva padrão.....	35
Tabela 6 Oligonucleotídeos utilizados para a quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real.....	36
Tabela 7 Características dos Pacientes de ATL estudados nas diferentes formas clínicas.....	38
Tabela 8 Portadores assintomáticos adultos.....	38
Tabela 9 Características dos Pacientes de DIH estudados.....	39
Tabela 10 Portadores assintomáticos da faixa infantojuvenil.....	39

BATISTA, Everton da Silva. Avaliação quantitativa de genes da região *pX* na Leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) e na Dermatite infecciosa associada ao HTLV-1 (DIH). 57 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2015.

RESUMO

INTRODUÇÃO: No presente estudo, foram avaliados, de forma quantitativa os genes *p12*, *p13*, *p30*, *tax* e *HBZ*, todos da região *pX* do HTLV-1. Estes genes desempenham importantes papéis na manutenção do vírus dentro do indivíduo infectado, como o escape do sistema imunológico, ativação de fatores de crescimento e consequente proliferação e inibição da apoptose em células infectadas. **METODOLOGIA:** Por tanto, avaliou-se, por PCR quantitativa em tempo real, os níveis de expressão dos produtos dos genes *p12*, *p13*, *tax* e *HBZ* da na Leucemia/linfoma das células T do adulto (ATL) e nos portadores do HTLV-1 da faixa infantojuvenil. **RESULTADOS:** Verificamos maiores níveis de expressão de *p12* em pacientes adultos, infantojuvenis e indivíduos assintomáticos, o que pode indicar um papel importante desse gene não só na manifestação das doenças associadas ao vírus, mas também nos períodos de latência. Encontramos também uma maior expressão de *HBZ* que *tax*, nos diferentes grupos de indivíduos estudados, o que corrobora com dados prévios de estudos de expressão gênica do HTLV-1, aumentando as evidências da importância do balanço transcricional viral. **CONCLUSÃO:** Esses achados podem contribuir na compreensão da associação dos mecanismos de expressão e manifestações clínicas e progressão das patologias da fase infantojuvenil para as patologias da fase adulta.

Palavras-chave: Leucemia, *tax*, *HBZ*, infantojuvenil, genes

BATISTA, Everton da Silva. Quantitative evaluation of the *pX* region genes in Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and Infective dermatitis associated with HTLV-1 (IDH). 57 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2015.

ABSTRACT

INTRODUCTION: In the present study, the *p12*, *p13*, *p30*, *tax* and *HBZ* genes, all of the *pX* region of HTLV-1, were quantitatively evaluated. These genes play important roles in maintaining the virus within the infected host, such as the escape of the immune system, activation of growth factors and consequent proliferation and inhibition of apoptosis in infected cells. **METHODOLOGY:** The levels of expression of the *p12*, *p13*, *tax* and *HBZ* gene products in adult T-cell leukemia / lymphoma (ATL) and HTLV-1 carriers in the infant and child band were therefore evaluated. **RESULTS:** We found higher levels of *p12* expression in adult patients, childhood and asymptomatic individuals, which may indicate an important role of this gene not only in the manifestation of diseases associated with the virus, but also in the latency periods. We also found a higher expression of *HBZ* than *tax* in the different groups of individuals studied, which corroborates previous data from HTLV-1 gene expression studies, increasing the evidence for the importance of viral transcriptional balance. **CONCLUSION:** These findings may contribute to the understanding of the association of expression mechanisms and clinical manifestations and the progression of the pathologies of the childhood phase to the pathologies of the adult phase.

Keywords: Leukemia, *tax*, *HBZ*, childhood, genes

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS	15
1.2	EPIDEMIOLOGIA	17
1.3	TRANSMISSÃO	18
1.4	MECANISMOS DE PATOGENICIDADE DO HTLV-	18
1.5	DOENÇAS ASSOCIADAS COM O HTLV-1	19
1.5.1	Leucemia/Linfoma de células T do Adulto (ATL)	19
1.5.2	Mielopatia Associada ao HTLV-1/ Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP)	20
1.5.3	Dermatite Infecciosa associada ao HTLV-1	21
1.6	GENES VIRAIS E SEUS PRODUTOS	23
1.6.1	O gene <i>tax</i>	23
1.6.2	O gene <i>HBZ</i>	24
1.6.3	O gene <i>p12</i>	25
1.6.4	O gene <i>p13</i>	26
1.6.5	O gene <i>p30</i>	27
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	METODOLOGIA	31
4.1	EXTRAÇÃO DE DNA	31
4.2	QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL (CPV)	31
4.3	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE RNA E CDNA	32
4.4	CONSTRUÇÃO DAS CURVAS-PADRÃO PARA <i>p12</i> , <i>p13</i> , <i>p30</i> E <i>HPRT</i>	32
4.4.1	PCR quantitativa em tempo real para <i>p12</i>, <i>p13</i>, <i>p30</i> e <i>HPRT</i>	34
4.5	CONSTRUÇÃO DAS CURVAS-PADRÃO PARA <i>TAX</i> , <i>HBZ</i> E <i>HPRT</i>	34
4.5.1	PCR quantitativa em tempo real para <i>tax</i>, <i>HBZ</i> e <i>HPRT</i>	35
4.6	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	36

4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
5	RESULTADOS	37
5.1	POPULAÇÃO ESTUDADA.....	37
6	EXPRESSÃO DOS GENES <i>p12</i>, <i>p13</i> E <i>p30</i> EM PACIENTES COM ATL E EM PORTADORES ASSINTOMÁTICOS ADULTOS	39
6.1	EXPRESSÃO DOS GENES <i>p12</i> , <i>p13</i> E <i>p30</i> NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA ATL E EM ASSINTOMÁTICOS ADULTOS.....	40
6.2	CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS <i>p12</i> , <i>p13</i> E <i>p30</i> NOS PACIENTES DE ATL E NOS PORTADORES ASSINTOMÁTICOS ADULTOS	43
6.3	CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS <i>p12</i> , <i>p13</i> E <i>p30</i> E A CPV NOS PACIENTES DE ATL E NOS PORTADORES ASSINTOMÁTICOS.	43
7	EXPRESSÃO DOS GENES <i>p12</i>, <i>p13</i> E <i>p30</i> EM PACIENTES E EM PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DA FAIXA ETÁRIA INFANTO-JUVENIL INFECTADOS PELO HTLV-1	43
7.1	EXPRESSÃO DOS GENES <i>p12</i> , <i>p13</i> E <i>p30</i> NOS DIFERENTES GRUPOS DOS INDIVÍDUOS DA FAIXA ETÁRIA INFANTOJUVENIL.....	44
7.2	CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS <i>p12</i> , <i>p13</i> E <i>p30</i> NOS PACIENTES COM DIH E DIH/HAM/TSP E PORTADORES ASSINTOMÁTICOS	45
7.3	CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS <i>p12</i> , <i>p13</i> E <i>p30</i> E A CPV NOS PACIENTES COM DIH E DIH/HAM/TSP E PORTADORES ASSINTOMÁTICOS	46
8	EXPRESSÃO DOS GENES <i>HBZ</i> (TRANSCRITOS <i>HBZ</i> E <i>HBZ-SI</i>) E <i>tax</i> NOS PORTADORES DO HTLV-1 DA FAIXA INFANTOJUVENIL	46
8.1	EXPRESSÃO DOS GENES <i>HBZ</i> (TRANSCRITOS <i>HBZ</i> E <i>HBZ-SI</i>) E <i>tax</i> NOS PACIENTES DE DIH E COM MANIFESTAÇÃO SIMULTÂNEA DE DIH E HAM/TSP	46
8.2	EXPRESSÃO DOS GENES <i>HBZ</i> (TRANSCRITOS <i>HBZ</i> E <i>HBZ-SI</i>) E <i>tax</i> NOS PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DO HTLV-1 NA FAIXA INFANTO JUVENIL	47
8.3	COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS <i>HBZ</i> E <i>tax</i> NOS DIFERENTES GRUPOS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1 NA FAIXA ETÁRIA INFANTOJUVENIL.	48
8.4	CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS <i>HBZ</i> E <i>tax</i> NOS PACIENTES DE DIH E PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DA FAIXA ETÁRIA INFANTOJUVENIL	48

8.5	CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES <i>HBZ</i> E <i>tax</i> COM A CPV NOS PACIENTES DE DIH E PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DA FAIXA ETÁRIA INFANTOJUVENIL	49
9	COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE <i>p12</i>, <i>p13</i> E <i>p30</i> NA DIH E ATL.....	49
10	DISCUSSÃO.....	50
	EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS DA REGIÃO <i>pX</i> NA ATL.....	50
	EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS NA FAIXA INFANTOJUVENIL.....	51
	COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE <i>p12</i> , <i>p13</i> E <i>p30</i> NA DIH E ATL	53
11	CONCLUSÕES.....	54
12	REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS

O HTLV-1 (Human T-cell lymphotropic virus) foi o primeiro retrovírus humano a ser identificado, nos Estados Unidos, a partir de uma paciente com linfoma cutâneo de células T, (POIESZ *et al.*, 1980) e no Japão, quando foi inicialmente identificado como ATLV (Adult T-cell Leukemia Virus) (YOSHIDA *et al.*, 1982).

Esse vírus pertence à família Retroviridae, à subfamília Orthoretrovirinae e ao gênero Deltaretrovirus. Pertence ainda ao grupo de retrovírus previamente identificado como PTLV (Primate T-cell Lymphotropic Virus) (SLATTERY, *et al.*, 1999).

Trata-se de um vírus com diâmetro de aproximadamente 100 a 140 nanômetros (nm), com o genoma composto por duas fitas simples de RNA (Figura 1) com polaridade positiva e um nucleocapsídeo icosaédrico com aproximadamente 80 a 100 nm (BURKE, 1997). O envelope é formado por uma proteína transmembrana (gp21) que é projetada para o exterior e ancora à proteína de superfície (gp46). Ligada à proteína do envelope, está a proteína da matriz Gag (gp19).

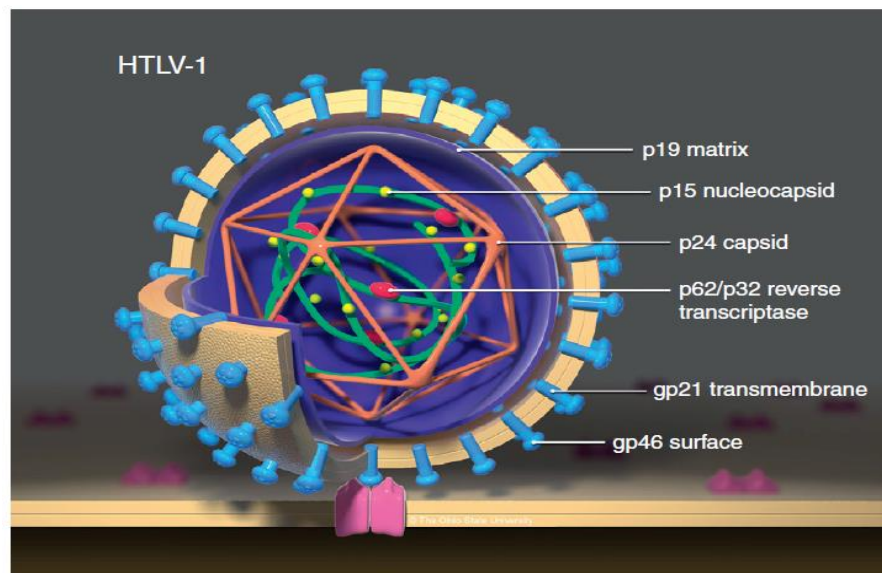


Figura 1: Estrutura do HTLV-1. **Fonte:** Laimore *et al.*, 2012.

No interior do capsídeo há outras proteínas, como a transcriptase reversa e a integrase, sendo estas proteínas essenciais no processo de integração do DNA viral no genoma da célula do hospedeiro, formando o DNA proviral (FRANCHINI *et al.*, 1995; GOFF *et al.*,

2001).

O genoma desse vírus apresenta 9,03Kb e contém os genes *gag*, *pol*, *env* e a região *pX* flanqueados por duas sequências terminais repetitivas (*long terminal repeats* – LTRs). A região localizada antes da região LTR 3', denominada *pX* (KORALNIK *et al.*, 1992), contém os genes responsáveis pela patogenicidade e manutenção viral como Tax (p40), rex (p27), HTLV-1 bZIP factor (*HBZ*), p12, p13, p30 e p21 (MATSUOKA e JEANG, 2007).

A região *pX* é constituída por 4 ORFs (Open Reading Frames). A orf-I codifica para a proteína p12, já as proteínas p13 e p30 são codificadas na orf-II (Figura 2), enquanto Rex e Tax, que estão intimamente relacionadas com a regulação da replicação viral, são codificadas pelas Orfs III e IV, respectivamente (KORALNIK *et al.*, 1992, KORALNIK *et al.*, 1993, FUKUMOTO *et al.*, 2009).

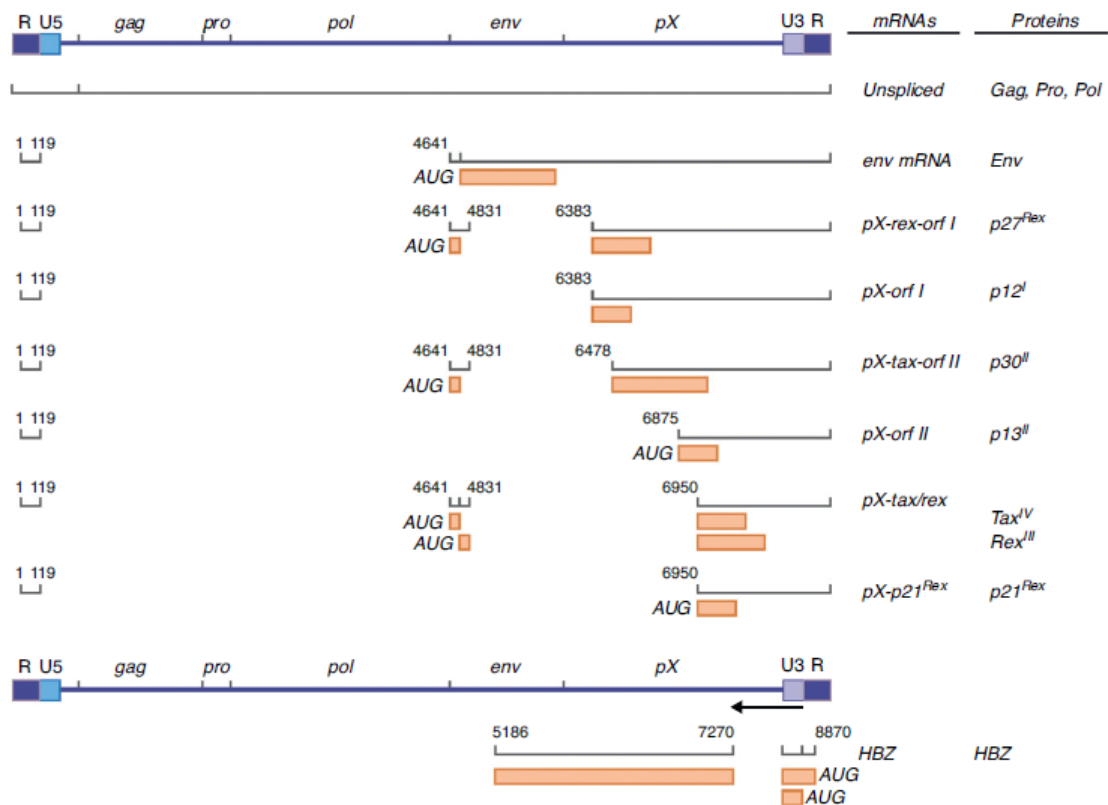


Figura 2: Genoma do HTLV-1. Fonte: Lairmore *et al.*, 2012

1.2 EPIDEMIOLOGIA

As principais áreas endêmicas são o sudoeste do Japão, algumas regiões do Caribe, América do Sul, incluindo principalmente partes da Colômbia e Guiana Francesa, áreas da África intertropical (como o Sul do Gabão) e alguns grupos isolados na Australo-Melanésia. Na Europa, o país que pode ser considerado endêmico é a Romênia (GESSAIN e CASSAR, 2012).



Figura 3: Áreas endêmicas do HTLV-1 no mundo. **Fonte:** Gessain, A. and Cassar, O., 2012

A infecção pelo HTLV-1 é endêmica e largamente distribuída entre grupos indígenas e afrodescendentes em países da América do Norte, América Central e América do Sul. No Brasil, diversos grupos indígenas estão distribuídos por oito estados que ocupam toda extensão da região amazônica (ISHAK *et al.*, 2003).

As maiores prevalências de infecção em amostras de banco de sangue foram detectadas nos estados do Maranhão (São Luis – 10.0/1000 doadores de sangue), Bahia (Salvador – 1,8% na população geral ou 9.4/1000 doadores de sangue), Pará (Belém – 9.1/1000 doadores de sangue) e Pernambuco (Recife – 7.5/1000 doadores de sangue) (CATALAN-SOARES *et al.*, 2005; DOURADO *et al.*, 2003).

1.3 TRANSMISSÃO

O HTLV-1 é transmitido pela via horizontal em relação sexual não protegida com portador do vírus, sendo que a transmissão mais frequente se dá do homem para a mulher, sugerindo que a infecção seja consequente de linfócitos infectados no sêmen e na secreção vaginal: pela via vertical, principalmente na amamentação e na possível transmissão transplacentária, durante o parto e pela via parenteral ocorrendo através de sangue contaminado e seus produtos, bem como o compartilhamento de seringas e material perfuro-cortante contaminados (SANTOS *et al.*, 2005).

O diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 é feito em duas etapas: triagem e confirmação por um ensaio de maior especificidade. Na triagem são realizados testes sorológicos, que testam a presença de anticorpos contra o vírus como, ELISA (ensaio imunoenzimático) ou aglutinação, já para a confirmação pode-se utilizar a técnica de *Western Blot* (FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2005).

Existe uma variedade de condições clínicas associadas com o HTLV-1, e mais recentemente com o HTLV-2, tornando o diagnóstico diferencial do vírus um fator importante para atender e aconselhar os indivíduos infectados pelo HTLV (JACOB *et al.*, 2007).

1.4 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE DO HTLV-1

O HTLV-1 tem como principal alvo os linfócitos T CD4+ de memória e de forma secundária, infecta linfócitos T CD8+, monócitos, macrófagos, megacariócitos, células dendríticas e células da glia (BANGHAM *et al.*, 2003; MANEL *et al.*, 2005; SWAINSON *et al.*, 2005).

A propagação do vírus no indivíduo infectado ocorre principalmente através de “sinapses virológicas” onde acontece a transferência do material viral de uma célula infectada para outra célula não infectada por contato direto entre as mesmas e pela proliferação clonal dos linfócitos infectados, onde produtos dos genes virais estimulam a divisão da célula hospedeira (BANGHAM *et al.*, 2003).

1.5 DOENÇAS ASSOCIADAS COM O HTLV-1

O HTLV-1 está associado a diversas doenças, dentre elas a leucemia/linfoma das células T do adulto – (ATL) (YOSHIDA *et al.*, 1985), a mielopatia associada ao HTLV-I/paraparesia espástica tropical – (HAM/TSP) (OSAME *et al.*, 1986) e dermatite infecciosa associada ao HTLV-1 – (DIH) (LA GRENADE *et al.*, 1990). É importante destacar que a maior parte dos portadores do HTLV-1 permanecem assintomáticos (SOARES *et al.*, 2000) e que ainda não se conhece claramente os fatores que levam um portador assintomático manifestar doença (JEFFERY *et al.*, 1999). Na Bahia, observam-se todas estas patologias causadas pelo HTLV-1 (BITTENCOURT *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2005; PRIMO *et al.*, 2005).

1.5.1 LEUCEMIA/LINFOMA DE CÉLULAS T DO ADULTO (ATL)

A ATL é uma forma muito agressiva de neoplasia das células T (geralmente CD4+), resistente à quimioterapia e geralmente fatal ocorrendo predominantemente na idade adulta. A diversidade das manifestações clínicas da ATL determinou a subdivisão da doença em cinco formas clínicas com características próprias: aguda, linfomatosa, tumoral primária de pele, crônica e *smoldering* (SHIMOYAMA *et al.*, 1991; BITTENCOURT *et al.*, 2007).

Indivíduos com a forma clínica aguda apresentam número elevado de células leucêmicas, linfadenopatia, hipercalcemia, hepatoesplenomegalia e lesões de pele, características que excluem os demais subtipos. Nessa forma clínica há evolução rápida para o óbito. O tempo de sobrevida é em torno de 6 meses.

A forma linfomatosa caracteriza-se por não apresentar linfocitose, por ter de 1% ou menos de linfócitos T atípicos no sangue periférico e linfadenopatia histologicamente comprovada com ou sem lesões extra-nodais. O tempo de sobrevida desta forma clínica é em torno de 10 meses.

A forma crônica apresenta linfocitose superior ao limite normal; valor do DHL (desidrogenase láctica) é até duas vezes superior ao limite normal, sem hipercalcemia, sem envolvimento do SNC (sistema nervoso central), trato gastrointestinal e nem ascite ou derrame pleural. Pode ser comprovado histologicamente linfadenopatia com ou sem lesões extra-nodais e pode haver também envolvimento do fígado, baço, pele, pulmão e apresenta 5% ou mais de linfócitos T atípicos no sangue periférico na maioria dos casos.

O tempo de sobrevida é aproximadamente de 24 meses. A forma *smoldering* apresenta 5% ou mais de linfócitos T atípicos no sangue periférico, nível de linfócitos normais ($<4 \times 10^9/L$), sem hipercalcemia, DHL de até 1,5 vezes superior o limite normal, sem linfadenopatia; sem envolvimento do fígado, baço, SNC, do trato gastrointestinal e nem ascite ou derrame pleural. Lesões de pele ou pulmonar podem estar presentes. Em pacientes com $<5\%$ de linfócitos T atípicos no sangue periférico, pelo menos, uma lesão de pele é histologicamente comprovada e lesões pulmonares devem estar presentes. O tempo de sobrevida desta forma clínica é em torno de 58 meses (SHIMOYAMA et al., 1991; MATSUOKA, 2000; YASUNAGA e MATSUOKA, 2007). Já a forma tumoral primária de pele é caracterizada por apresentar tumores cutâneos e ausência de linfocitose, hipercalcemia ou linfadenomegalia, apresenta também envolvimento linfonodal e de órgãos internos. Os níveis de DHL são pouco elevados e nesta forma, os linfócitos atípicos no sangue periférico mantêm-se abaixo de 5%. O tempo de sobrevida é aproximadamente de 21 meses (BITTENCOURT et al., 2007). Deste modo as formas crônica e *smoldering* apresentam um curso clínico menos agressivo, enquanto que os pacientes com as formas aguda, linfoma e tumoral primária de pele apresentam em geral um tempo de sobrevida menor que 2 anos (BITTENCOURT et al., 2007).

Os fatores que determinam o desenvolvimento dessa patologia nesta percentagem de portadores ainda são desconhecidos, além disso, também não se conhecem os fatores que determinam a manifestação de uma ou outra forma clínica. Na Bahia, a ATL corresponde a 33% dos casos diagnosticados de linfomas T em geral (BARBOSA et al., 1997).

1.5.2 MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-1/ PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL (HAM/TSP)

Desenvolve-se em aproximadamente 4% das pessoas infectadas com o HTLV-1 (ORLAND et al., 2003) e é mais frequente no gênero feminino. A media da idade de inicio da doença é de 46 anos (MORENO-CARVALHO et al., 1992; NAKAGAWA, 1995). A HAM/TSP é uma doença inflamatória crônica na qual ocorrem lesões no sistema nervoso central. O quadro clínico corresponde a paraparesia espástica crônica e progressiva, envolvendo principalmente o trato piramidal (reflexos exaltados nos membros inferiores, clônus e sinal de Babinski), com fraqueza proximal nos membros inferiores, bexiga neurogênica e lombalgia (NAKAGAWA, 1995).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o quadro clínico e a presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e no líquido são considerados critérios essenciais para o diagnóstico da HAM/TSP (OSAME *et al.*, 1986; PRIMO *et al.*, 2005). Estudos demonstraram que a CPV do HTLV-1 no sangue periférico em pacientes com HAM/TSP é significativamente maior que nos portadores assintomáticos (KIRA *et al.*, 1991).

1.5.3 DERMATITE INFECCIOSA ASSOCIADA AO HTLV-1

A DIH foi descrita na Jamaica (SWEET *et al.*, 1966) e mais tarde associada ao HTLV-1 (LA GRENADÉ *et al.*, 1990). Ocorre geralmente na faixa infantojuvenil, em crianças que adquirem o vírus principalmente por via vertical e com mais frequência em portadores do sexo feminino (BITTENCOURT *et al.*, 2006, OLIVEIRA *et al.*, 2005). Pode iniciar-se depois do décimo oitavo mês de vida e raramente persiste até a idade adulta (GONÇALVES *et al.*, 2000). Foi relatado apenas um caso de DIH onde ocorreu transmissão por transfusão de sangue e raros casos de DIH no adulto (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

As maiores coortes de DIH tem sido reportadas na Jamaica e mais recentemente na Bahia (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Uma pequena série de casos foi descrita em Trinidad e Tobago (SUITE *et al.*, 1994), Peru (AQUIJE *et al.*, 2002) e Senegal (MAHÉ *et al.*, 2004). De maneira interessante, no Japão, onde a prevalência da infecção por HTLV-1 é elevada, apenas dois casos de crianças com DIH foram descritos, ambos os casos evoluíram para a ATL na idade adulta (TSUKASAKI *et al.*, 1994).

A DIH é uma forma de eczema grave, infectado e recidivante. As lesões na DIH são eritematosas, escamosas e formam crostas. Envolvem o couro cabeludo e região retro-auricular (Figura 4A), dobras de membros superiores, genitália, narina (Figura 4B), dentre outras partes do corpo. Os principais critérios para diagnóstico da DIH são: 1. Eczema do couro cabeludo, axilas, virilhas, pavilhão auricular, regiões retroauriculares, pálpebras, pele paranasal e/ou pescoço; 2. Rinorréia crônica e/ou lesões crostosas no vestíbulo nasal; 3. Dermatite crônica recidivante com resposta imediata à antibioticoterapia e com recidiva após suspensão do tratamento; 4. Início precoce na infância; 5. Soropositividade para o HTLV-1. Segundo esses autores, a inclusão dos itens 1, 2 e 5 e o envolvimento de pelo menos duas regiões do corpo para preenchimento do critério 1 são obrigatórios. A DIH associa-se com infecção *por Staphylococcus aureus*

e/ou *β-hemolyticus* (LA GRENADE *et al.*, 1998).



Figura 4 – Lesões características da DIH em região retroauricular (A) e nas narinas (B).
Fonte: Dra. Achiléa Bittencourt (fotos cedidas)

Na Bahia, foi observado que aproximadamente 30% dos casos de DIH também manifestam a forma infantojuvenil de HAM/TSP (PRIMO *et al.*, 2005). A DIH e a ATL parecem estar relacionadas (HANCHARD *et al.*, 1991). Dados de nosso grupo mostram que 34% dos casos de ATL primariamente cutâneos têm história previa de DIH (BITTENCOURT *et al.*, 2005). Na literatura foram descritos raros casos de DIH que evoluíram para ATL (TSUKASAKI *et al.*, 1994; HANCHARD *et al.*, 1991; LA GRENADE *et al.*, 1995, Oliveira Pedro 2013). Recentemente foi descrito na Bahia um caso de manifestação simultânea de ATL e HAM/TSP em uma adolescente com DIH (FARRE *et al.*, 2008). Estes dados sugerem que a DIH poderia representar um indicador prognóstico de condições patológicas associadas ao HTLV-1 que possam vir à ocorrer em etapas mais tardias, como a ATL.

A patogênese da DIH é ainda desconhecida. Não se sabe por que apenas algumas crianças infectadas desenvolvem esta doença, a maioria permanecendo assintomática. Existe a possibilidade de que o desenvolvimento dessa dermatite esteja ligado a fatores genéticos e/ou relacionados com a interação do vírus com o portador (PROIETTI *et al.*, 2005). Recentemente, foi demonstrado que os pacientes com DIH

apresentam uma resposta imune tipo 1 exacerbada, com alta produção de TNF- α e IFN- γ (Figura 5) pelas células mononucleares do sangue periférico, muito semelhante à observada em pacientes adultos com HAM/TSP (NASCIMENTO *et al.*, 2009). Apresentam também, CPV (carga proviral) elevada quando comparados aos portadores assintomáticos adultos e similar aos pacientes adultos com HAM/TSP (PRIMO *et al.*, 2009).

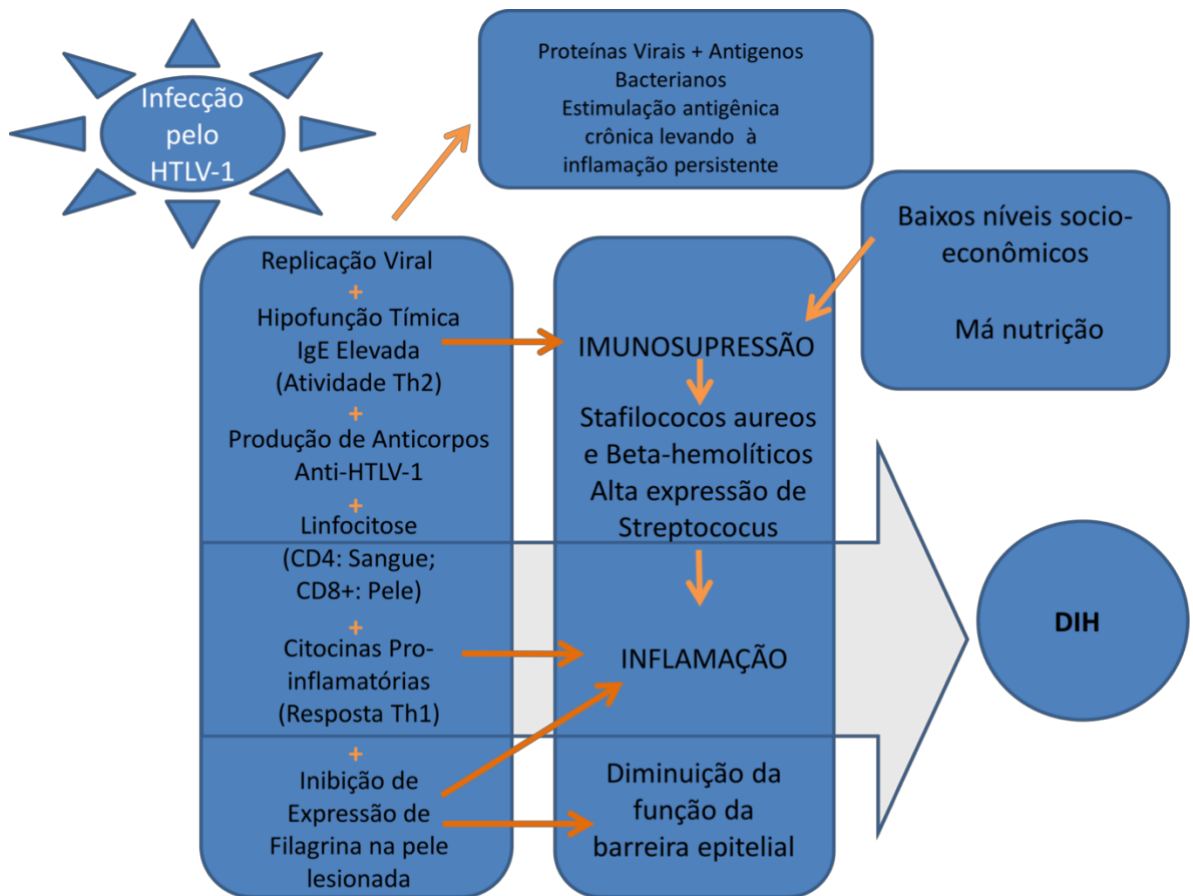


Figura 5: Esquema representativo do mecanismo de patogênese da DIH. **Fonte:** ADAPTADO DE MCGILL *et al.*, 2012

1.6 GENES VIRAIS E SEUS PRODUTOS

1.6.1 O GENE *tax*

O gene *tax* codifica uma proteína de 40 kD, principalmente localizada no núcleo, que é responsável pela ativação transcricional do 5'LTR do HTLV-1. Esta

proteína é apontada pela literatura como a principal responsável pela patogenicidade e oncogenicidade do HTLV-1 por ser capaz de estimular a proliferação e inibir a apoptose das células infectadas, interferindo em vias celulares como a de AKT (*serine/threonine kinase*), NF- κ B e p53 (MATSUOKA, 2005). Ela também desencadeia uma infinidade de outros eventos como regulação do ciclo celular, interferência no controle do *checkpoint* e inibição do reparo do DNA (KANNIAN e GREEN, 2010).

A infecção pelo HTLV-1 confere uma vida útil longa devido às ações pleiotrópicas de Tax, resultando em um aumento do número de células infectadas. Tais células infectadas são essenciais para a transmissão do HTLV-1. (MATSUOKA, 2005).

Porém, dados na literatura mostram que a expressão de *tax* é baixa ou inexistente nas formas graves da ATL. Um dos motivos que poderia explicar este fenômeno é que esta proteína é o principal alvo das células citotóxicas (KANNAGI *et al.*, 1991).

1.6.2 O GENE *HBZ*

Mais recentemente foi descrito um novo gene viral, o *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)* (GAUDRAY *et al.*, 2002) que está localizado na porção 3' LTR do provírus (LAROCCA *et al.*, 1989; SATOU *et al.*, 2006) e que, através do seu mRNA é capaz de estimular a proliferação celular dos linfócitos T. O gene *HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ)* é codificado a partir da fita *antisense* do genoma proviral, o mRNA é sintetizado no sentido contrário a partir de um promotor funcional localizado na LTR 3' (MESNARD *et al.*, 2006; GAUDRAY *et al.*, 2002).

A proteína codificada por este gene é capaz de inibir a expressão por Tax (SATOU *et al.*, 2006) e não é reconhecida pelas células T citotóxicas do hospedeiro. Assim, sugere-se que a expressão do gene *tax* poderia ser substituída pela expressão do gene *HBZ*, que passaria a ser responsável pela contínua proliferação das células infectadas (SATOU *et al.*, 2006). Porém, ainda não foi esclarecido como o balanço da expressão destes dois genes virais *tax* e *HBZ* influencia e/ou contribui no desenvolvimento e evolução das patologias relacionadas com o HTLV-1.

Um recente trabalho mostra a expressão do gene *HBZ* nas células infectadas de portadores assintomáticos, pacientes com HAM/TSP e ATL. Essa expressão de *HBZ* geralmente ocorre na ausência da expressão de *tax* (SAITO *et al.*, 2009).

1.6.3 O GENE *p12*

O gene *p12*, localizado na *orf-I* do HTLV-1, codifica para a proteína p12, a qual pode sofrer clivagem proteolítica e gerar a proteína p8 (FUKUMOTO *et al.*, 2009). A proteína p12 localiza-se em endomembranas celulares, particularmente dentro do retículo endoplasmático e do complexo de golgi, enquanto que p8 direcionada para as *rafts* lipídicas na superfície celular e é recrutada para as sinapses imunológicas na ligação com o receptor de célula T (KORALNIK *et al.*, 1993; DING *et al.*, 2001).

Dentro do retículo endoplasmático, p12 é responsável por mediar um aumento no cálcio citossólico em células T (Figura 6), aumentando a liberação de cálcio do retículo endoplasmático, através de receptores trifosfato inositol e da entrada de cálcio por canais na membrana plasmática, em resposta ao baixo teor de cálcio. A literatura aponta *p12* como responsável também pela ativação do fator nuclear de células T ativadas (NFAT), o qual é dependente de ligação de cálcio para sua desfosforilação e importação nuclear, para aumentar a proliferação de células T (DING *et al.*, 2003; ALBRECHT *et al.*, 2002).

p12 ainda pode impactar outras proteínas reguladas por cálcio, incluindo o coativador transcricional p300, o qual pode modular transcrição de genes virais do HTLV-1 (NAIR, A. *et al.*, 2005). Além do mais, pode promover a transmissão célula-a-célula, induzindo o antígeno associado à função do linfócito (LFA-1) agrupando células T através de um mecanismo dependente de cálcio (KIM *et al.*, 2006).

No retículo endoplasmático, *p12* liga-se à cadeia pesada da nova molécula de MHC-I sintetizada e impede a ligação com a β 2-microglobulina, um componente do complexo MHC-I maduro. Essa molécula mal formada é removida do retículo endoplasmático e degradada pelo proteossoma, resultando na diminuição da expressão do MHC-I na superfície celular o que, conseqüentemente diminui a apresentação de peptídeos virais e reconhecimento pelos linfócitos T citotóxicos.

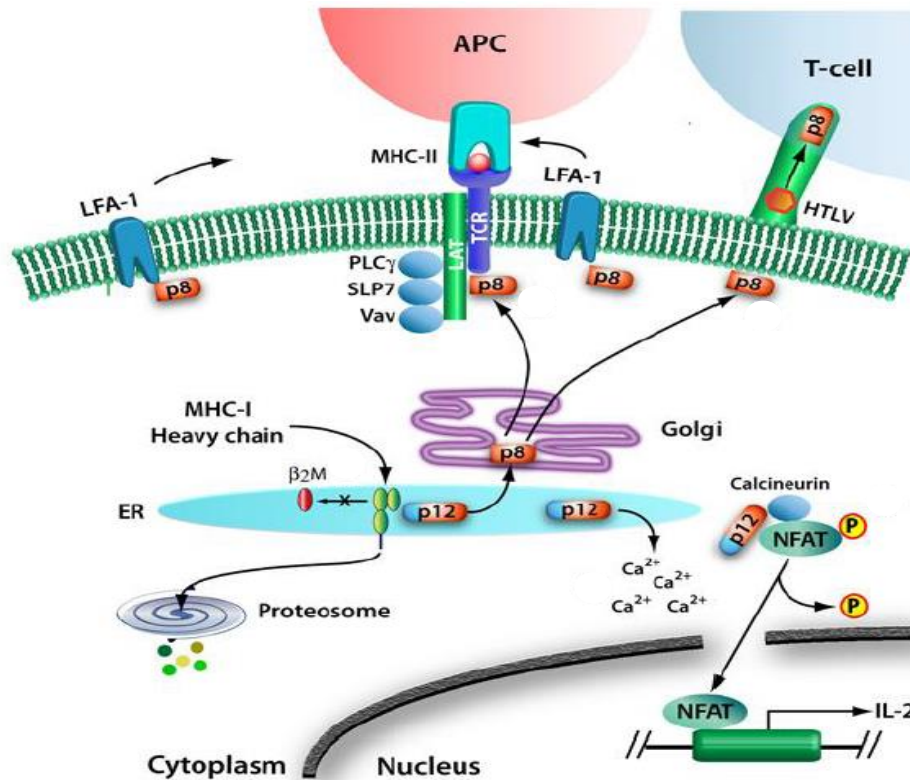


Figura 6: Diversidade de ações da proteína p12. **Fonte:** EDWARDS *et al.*, 2011.

1.6.4 O GENE *p13*

Um splicing de mRNA na *orf-II* resulta na produção da proteína p13 (BERNEMAN, *et al.*, 1992) que está localizada principalmente na membrana interna da mitocôndria (D'AGOSTINO *et al.*, 2002; CIMINALE *et al.*, 1999), no entanto, quando se expressa em níveis elevados, a proteína é capaz de localizar-se no núcleo e quando co-expressa com a Tax, é dirigida para o nucléolo. A localização de p13 dentro da mitocôndria e do núcleo sugere que essa proteína pode estar relacionada com apoptose e regulação transcricional (EDWARDS *et al.*, 2011).

Foi a primeira proteína a ser identificada como indutora de mudanças na morfologia e distribuição mitocondrial (CIMINALE *et al.*, 1999; SILIC-BENUSSI *et al.*, 2010). Em altas concentrações, p13 induz o aumento irreversível do volume mitocondrial, despolarização e liberação do citocromo *c* que é um componente da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria e está envolvido com o inicialização da apoptose (EDWARDS *et al.*, 2011).

Embora p13 reduza a absorção de cálcio mitocondrial, a concentração

citossólica de cálcio não é alterada, o que sugere que a p13 pode alterar a concentração de cálcio apenas localmente (BIASIOTTO *et al.*, 2010).

Essa proteína também parece estar associada com o aumento da produção de ROS (reactive oxygen species) (Figura 7), levando a ativação de células T primárias em repouso. Por essa associação, acredita-se que p13 tem um papel importante na persistência da infecção do HTLV-1 no hospedeiro, aumentando o número de células infectadas não transformadas e diminuindo o número de células infectadas transformadas (SILIC-BENUSSI *et al.*, 2010).

Uma associação de p13 ubiquitinada com a proteína Tax foi relacionada com a inibição da ligação com o complexo coativador transcricional CBP/p300, gerando uma diminuição na transcrição viral mediada por Tax (ANDRESEN *et al.*, 2011).

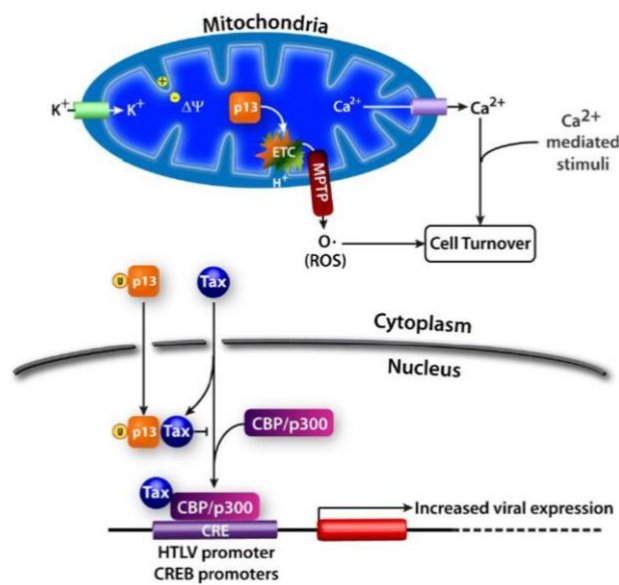


Figura 7: Ações de p13 a nível mitocondrial e nuclear. **Fonte:** EDWARDS *et al.*, 2011.

1.6.5 O GENE *p30*

A proteína codificada por este gene localiza-se no núcleo e nucléolo e essa localização sugere um papel importante na retenção de novos transcritos virais formados dentro do núcleo como o mRNA de tax/rex (Figura 8) que são reguladores positivos da transcrição viral. (TAYLOR *et al.*, 2009), assim, p30 promove a latência e escape da vigilância imune do hospedeiro para favorecer a propagação através da divisão celular e expansão clonal das células infectadas. Estudos tem demonstrado a capacidade de p30 em alterar a expressão

algumas famílias de genes, principalmente aqueles que envolvidos na transcrição, tradução, progressão do ciclo celular, replicação e reparo do DNA, sinalização celular, angiogênese, migração celular e apoptose (TAYLOR *et al.*, 2009 ; LAIRMORE *et al.*, 2007).

A expressão de p30 resulta no acúmulo de células na fase G2 do ciclo celular. Ao inibir a formação do complexo ciclinaE-CDK2, p30 atrasa a entrada das células na fase S do ciclo celular (DATTA *et al.*, 2007).

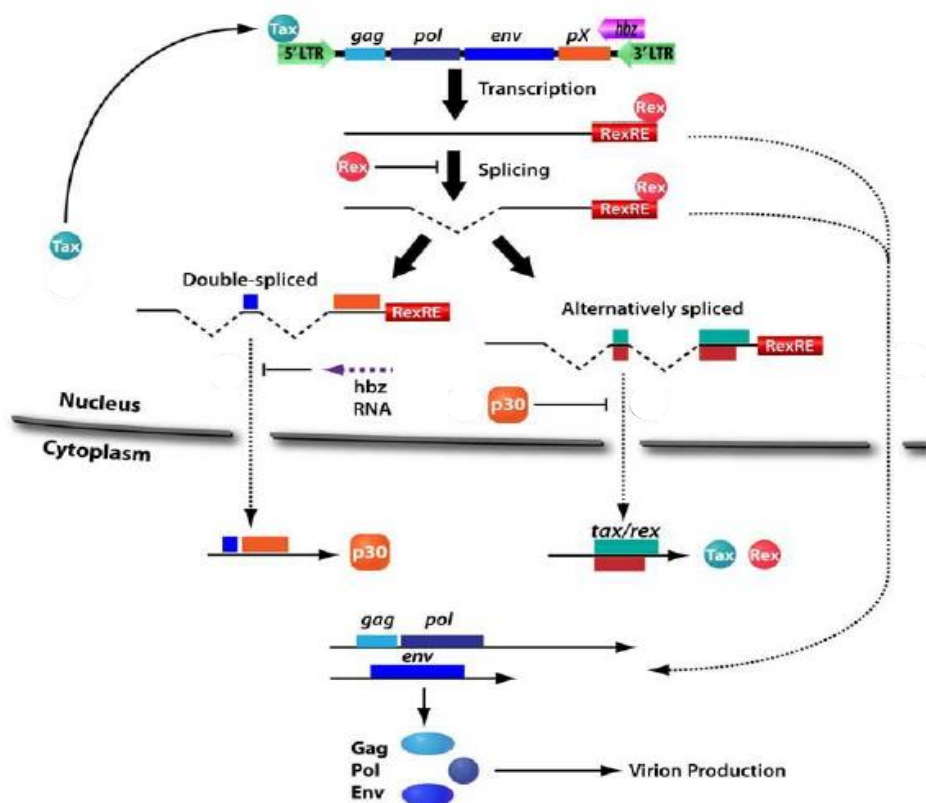


Figura 8: O papel regulatório de p30 na transcrição viral. **Fonte:** EDWARDS *et al.*, 2011.

2. JUSTIFICATIVA

O HTLV-1 está associado com diversas doenças, dentre elas as mais estudadas são a DIH, HAM/TSP e a ATL. Alguns genes virais estão mais expressos quando há a manifestação de alguma dessas patologias e isso sugere um papel importante deles no aparecimento e manutenção dessas enfermidades. A literatura aponta algumas proteínas virais como Tax e Hbz, como sendo fundamentais na manutenção viral, fazendo o balanço entre a expressão e a inibição da expressão de outras proteínas, visando escapar do sistema imune do hospedeiro e manter a proliferação das células infectadas.

Mais recentemente, outras proteínas foram associadas às funções importantes relacionadas à infecção pelo HTLV-1, uma delas é a proteína viral p12, que está intimamente associada com processos que desestabilizam a célula, dificultando inclusive na apresentação de antígenos virais para os linfócitos T citotóxicos. É importante citar as proteínas virais p13 e p30 também, que desempenham funções na mitocôndria e no núcleo celular.

Atualmente não existe tratamento específico para as principais doenças associadas ao vírus e também não se conhecem os fatores associados com a manifestação e evolução de uma doença para outra, como no caso da evolução da DIH para HAM/TSP ou ATL, o que já foi reportado pela literatura. Esse trabalho pode auxiliar no esclarecimento e identificação desses mecanismos e, apontar ainda, possíveis marcadores, tanto na DIH, quanto na ATL, além de possibilitar comparações em doenças de estágios mais iniciais de infecção, como no caso da DIH e em doenças em estágios mais tardios, como no caso dos pacientes com ATL.

Na ATL, estes estudos de expressão gênica de *tax* e *HBZ*, somente foram realizados considerando as formas mais agressivas da doença e em estudos oriundos do Japão que incluíram pequenos grupos de pacientes ou linhagens celulares (SATOUE et al., 2006). Na Bahia, a forma *smoldering* da doença é mais reportada que no Japão (BITTENCOURT et al., 2009).

Os estudos disponíveis sobre os genes *p12*, *p13* e *p30*, foram realizados em linhagens celulares ou animais, mas não em pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os níveis de expressão dos produtos dos genes *p12*, *p13*, *tax* e *HBZ* da na Leucemia/linfoma das células T do adulto (ATL) e nos portadores do HTLV-1 da faixa infantojuvenil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Quantificar a expressão dos mRNAs dos genes virais *p12*, *p13* e *p30* nos pacientes de ATL e portadores do HTLV-1 da faixa infantojuvenil

3.2.2 Quantificar a carga proviral e a expressão dos mRNAs dos genes *tax* e *HBZ* nos portadores do HTLV-1 da faixa infantojuvenil.

3.2.3 Avaliar as possíveis correlações entre os níveis de mRNAs encontrados dos diferentes genes analisados e com a carga proviral dos pacientes.

4. METODOLOGIA

4.1 EXTRAÇÃO DE DNA

A partir das PBMCs foi realizada a extração de DNA com o kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN). A quantificação do DNA foi avaliada através do espectrofotômetro *Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer)*.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PROVIRAL (CPV)

Para realizar a análise da CPV, partiu-se de 30ng de DNA para cada amostra. A CPV foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real e o sistema usado foi o TaqMan e como gene referência humano foi utilizado a *β -globina*.

Para a construção das curvas de referência para o gene *tax* e o gene *β -globina* (controle endógeno humano) foram utilizados produtos de PCR obtidos a partir da amplificação com os oligonucleotídeos descritos na tabela 1 e após isto, foi calculado o número de moléculas existente e realizou-se uma diluição seriada de 10^6 - 10^1

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores para obtenção do fragmento do gene *tax* e do gene de referência *β -globina*, por PCR convencional, utilizados para a construção da curva padrão.

Seqüência	Posição	Utilização
5'- CAGCCCCTGTCTCCACTTG -3'	6871-6893	<i>tax</i> (sense)
5'- ACCTTGAGGGTCTTAGAGGTTC -3'	7565-7586	<i>tax</i> (antisense)
5'- GGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCC -3'	62103-62125	<i>β-globina</i> (sense)
5'- GTCTTCTGTCTCCACATGCCCA -3'	62325-62348	<i>β-globina</i> (antisense)

Para a quantificação dos genes *tax* e *β -globina* por PCR em tempo real foram usados os oligonucleotídeos e as sondas como estão descritos na tabela 2. As reações foram realizadas no aparelho *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando o kit *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As condições de amplificação foram: 50° por 2min, 95° por 10min, 95° por 15s e 60° por 1min, num total de 40 ciclos. A CPV foi expressa como número de cópias do HTLV-1/100 células do PBMC. Os resultados foram analisados mediante o software *7500 v2.0.1* (Applied Biosystems). As avaliações foram feitas em duplicata e a curva padrão foi repetida para cada placa.

Tabela 2: Oligonucleotídeos e sondas utilizados para a quantificação da carga proviral por PCR em tempo real para os genes *tax* e *β-globina*.

Seqüência	Utilização
5'- CCCACTTCCCAGGGTTTGGGA -3'	<i>tax</i> (sense)
5'- GGCCAGTAGGGCGTGA -3'	<i>tax</i> (antisense)
5'-FAM/CCAGTCTAC/ZEN/GTGTTTGGAGACTGTGTACA/3IABkFQ -3'	<i>tax</i> (sonda)
5'- GTGCACCTGACTCCTGAGGAGA -3'	<i>β-globina</i> (sense)
5'- CCTTGATACCAACCTGCCAG -3'	<i>β-globina</i> (antisense)
5'- FAM/AAGGTGAAC/ZEN/GTGGATGAAGTTGGTGG/3IABkFQ -3'	<i>β-globina</i> (sonda)

4.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE RNA E cDNA

Aproximadamente 20 mL foram coletados de sangue periférico, do qual foram separadas as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) por gradiente de ficoll. As amostras foram homogeneizadas com a coluna *QIAshredder* (QIAGEN) e então prosseguiu-se com a extração de RNA que foi realizada utilizando o kit *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN). A amostras foram, imediatamente após a extração, tratadas com DNase em presença de inibidores de RNases. A quantificação do RNA foi avaliada através do espectrofotômetro *Nanodrop (ND-1000 Spectrophotometer)*.

As amostras de RNA, anteriormente extraídas, tratadas e quantificadas foram submetidas ao processo de transcrição reversa, onde foi utilizada uma mistura de iniciadores randômicos e oligoDT do kit *Superscript III* (InvitrogenTM), seguindo as instruções do fabricante. Partiu-se de 1µg de RNA total de cada amostra.

4.4 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS-PADRÃO PARA *P12*, *P13*, *P30* E *HPRT*

Os fragmentos para a construção da curva padrão foram amplificados a partir de PCR convencional. Os iniciadores utilizados para a amplificação estão descritos na tabela 3.

Para obtenção do fragmento para a construção das curvas dos genes virais *p12* e *p13* foram utilizados os oligos Frag F e Frag R (Tabela 3) na concentração de 0,4µM em 2,5µL de Tampão 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 0,4 mM de dNTP (InvitrogenTM), 1,5 mM de MgCl₂, e 1,25 unidades de Taq DNA Polimerase (InvitrogenTM). As condições de amplificação foram: 95° C por 5min, 95° C por 30seg, 55°C por 30seg, 72° C por 40seg e 72° C por 5min num total de 35 ciclos.

Já para a obtenção do fragmento para a construção da curva do genes viral *p30* foram utilizados os oligos P30 externo F e P30 externo R R (Tabela 3) na concentração de 0,4µM

em 2,5µL de Tampão 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 0,4 mM de dNTP (Invitrogen™), 0,8, mM de MgCl₂, e 1,25 unidades de Taq Polimerase (Invitrogen™). As condições de amplificação foram: 95° C por 5min, 95° C por 30seg, 58°C por 30seg, 72° C por 40seg e 72° C por 5min num total de 35 ciclos.

E para a amplificação do fragmento do gene referência *HPRT*, os oligos utilizados foram HPRT externo F e HPRT externo R na concentração de 0,4µM em 2,5µL de Tampão 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 0,4 mM de dNTP (Invitrogen™), 0,8, mM de MgCl₂, e 1,25 unidades de Taq Polimerase (Invitrogen™). As condições de amplificação foram: 95° C por 5min, 95° C por 30seg, 58°C por 30seg, 72° C por 40seg e 72° C por 5min num total de 35 ciclos.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores para obtenção do fragmento dos genes virais p12, p13 e p30 e o endógeno de referência *HPRT*, por PCR convencional, utilizados para a construção da curva padrão.

Seqüência	Posição	Utilização
5'- TTATTGCAACCACATCGCCTC -3'	6683-6703	p12 e p13 (sense)
5'- GAACCTCTAAGACCCTCAAGGT -3'	7565-7586	p12 e p13 (antisense)
5'- CTACGTGTTTGGAGACTGTGTACAAG -3'	6853-7160	p30 (sense)
5'- GTAGGCGGGCCGAACATAGT -3'	7231-7248	p30 (antisense)
5'- GCAGCCCTGGCGTCGTGATT -3'	73734-73748	HPRT (sense)
5'- CCCCTTGAGCACACAGAGGGC -3'	75873-75899	HPRT (antisense)

Os produtos das PCR anteriores foram visualizados em gel de poliacrilamida, purificados e sequenciados para comprovar que as seqüências amplificadas eram as seqüências de interesse utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Após isso, os fragmentos foram submetidos à diluições seriadas de 10⁹-1 gerando uma curva que foi amplificada no termociclador *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando o kit *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As condições de reação do PCR em tempo real foram: 50°C por 2min, 95° por 10min (Holding Stage), 95°C por 15seg e 60 °C por 1min (Cycling Stage), num total de 45 ciclos. A dissociação foi feita com 95°C por 15seg, 60°C por 1min e 95°C por 15seg.

Os dados foram analisados mediante o software *7500 software v2.0.1* (Applied Biosystems) e foram considerados o coeficiente de correlação (R²), que mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de Ct das amostras padrão, e o *Slope*, que indica a eficiência da amplificação para o ensaio.

As curvas foram amplificadas utilizando a química *SYBR Green* (Applied Biosystems), um corante que se liga em ligações por pontes de hidrogênio, e, portanto, pode

se associar à nucleotídeos que não são os estudados, logo foi necessário avaliar a curva de dissociação que fornece os resultados da especificidade da amplificação e em todos os casos, essas curvas apresentaram apenas um pico, sugerindo especificidade da reação.

4.4.1 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL PARA *p12*, *p13*, *p30* E *HPRT*

Foi utilizado 1µl do cDNA de cada amostra para a quantificação tanto dos genes virais quanto do gene referência.

Para o gene *p12*, os oligos utilizados foram P12F e P12R, para o gene *p13* os oligos foram P13F e P13R, para o gene *p30*, P30F e P30 R e por fim, para o gene referência *HPRT*, os oligos foram *HPRT F* e *HPRT R* (Tabela 4) na concentração de 0,4mM em uma reação de 25µl

Tabela 4 – Oligonucleotídeos iniciadores para quantificação das amostras para os genes virais *p12*, *p13* e *p30* e o endógeno de referência *HPRT*.

Seqüência	Posição	Utilização
5'- CAGCCCTTGTCTCCACTTG -3'	6874-6893	p12 (sense)
5'- TATTTGAAAAGGAAGGAAGAGGAGAA -3'	6975-7000	p12 (antisense)
5'- CTACGTGTTTGGAGACTGTGTACAAG -3'	7371-7396	p13 (sense)
5'- GGCGGGCCGAACATAGT -3'	7422-7438	p13 (antisense)
5'- CTACGTGTTTGGAGACTGTGTACAAG -3'	6853-7160	p30 (sense)
5'- GTAGGCGGGCCGAACATAGT -3'	7231-7248	p30 (antisense)
5'- TGACCTTGATTATTTGCATACC -3'	74898-74933	HPRT (sense)
5'- CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT -3'	75110-75122	HPRT (antisense)

4.5 CONSTRUÇÃO DAS CURVAS-PADRÃO PARA *tax*, *HBZ* E *HPRT*

A curva padrão foi obtida através de produtos de PCR para cada gene estudado. Os *primers* utilizados para a amplificação estão descritos na tabela 5. Esta curva foi obtida por diluições seriadas de 10⁹-10¹ dos produtos de PCR obtidos para *tax*, *HBZ* e *HBZ-SI* e o *HPRT*.

Os produtos das PCR anteriores foram visualizados em gel de poliacrilamida, purificados e sequenciados para comprovar que as seqüências amplificadas eram as de interesse. Esta comprovação foi realizada utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*.

Tabela 5 – Oligonucleotídeos iniciadores para obtenção do fragmento dos genes *tax*, *HBZ* (*HBZ* e *HBZ-SI*) e o *HPRT*, por PCR convencional, utilizados para a construção da curva padrão.

Seqüência	Posição	Utilização
5'- GATGGCACGCCTATGATTTC -3'	8074-8094	<i>tax</i> (sense)
5'- GCAGCCCTGGCGTCGTGATT -3'	73734-73748	HPRT (sense)
5'- CCCCTTGAGCACACAGAGGGC -3'	75873-75899	HPRT (antisense)
5'- CAGCCCCTTGTCTCCACTTG -3'	6874-6893	HBZ e HBZ-SI (sense)
5'- ACCTTGAGGGTCTTAGAGGTTC -3'	7565-7586	HBZ (antisense)
5'- TAAACTTACCTAGACGGCGG -3'	8761-8780	<i>tax</i> e HBZ-SI (antisense)

4.5.1 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL PARA *tax*, *HBZ* E *HPRT*

Para as análises das amostras, partiu-se do RNA extraído das células mononucleares do sangue periférico e a partir deste foi obtido o cDNA como descrito anteriormente. Para a PCR em tempo real utilizamos um termociclador *7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems)* utilizando o kit *SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)*. As condições de reação do PCR em tempo real foram: 50°C por 2min, 95°C por 10min, 95°C por 15seg e 62°C por 1min, num total de 45 ciclos. A dissociação foi feita com 95°C por 15seg, 60°C por 1min e 95°C por 15seg. Os *primers* utilizados na reação estão descritos na tabela 6. As amostras foram avaliadas partindo de 1µL de cDNA para cada reação. As avaliações foram feitas em duplicata e a curva padrão foi repetida para cada placa.

Os dados foram analisados mediante o software *7500 software v2.0.1 (Applied Biosystems)* e foram considerados o coeficiente de correlação (R^2), que mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de Ct das amostras padrão, e o *Slope*, que indica a eficiência da amplificação para o ensaio. Para normalizar os resultados por possíveis variabilidades na quantidade ou qualidade do RNA ou cDNA, também foram quantificados os transcritos totais do gene constitutivo humano o *HPRT*.

Como as curvas foram construídas utilizando o *SYBR Green (Applied Biosystems)*, um corante que se liga em ligações por pontes de hidrogênio, e, portanto, pode se associar à nucleotídeos que não são os estudados, foi necessário verificar a curva de dissociação que fornece os resultados da especificidade da amplificação e em todos os casos, essas curvas apresentaram apenas um pico, sugerindo especificidade da reação.

A estratégia utilizada para a análise da expressão do gene *HBZ* foi similar à descrita pelo gene *tax*, porém foram realizadas duas quantificações, pois foram descritos dois transcritos distintos para este gene (*HBZ* e o *HBZ-SI*). Assim, foi realizada a quantificação de cada um dos transcritos (MURATA *et al.*, 2006).

Tabela 6: Oligonucleotídeos utilizados para a quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real.

Seqüência	Posição	Utilização
5'- CGAAAAAGAGGCAGATGACAATG -3'	8286-8308	<i>tax</i> (sense)
5'- AAATGTTTTTCACTGAGAGGCTCTAA -3'	8338-8363	<i>tax</i> (antisense)
5'- TGACCTTGATTATTTTGCATAACC -3'	74898-74933	HPRT (sense)
5'- CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT -3'	75110-75122	HPRT (antisense)
5'- CAAGGATAATAGCCCGTCCA -3'	7214-7233	<i>HBZ</i> e <i>HBZ-SI</i> (sense)
5'- CAGTAGGGCGTGACGATGTA -3'	7439-7458	<i>HBZ</i> (antisense)
5'- TAAACTTACCTAGACGGCGG -3'	8761-8780	<i>HBZ-SI</i> (antisense)

4.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os pacientes e os responsáveis legais (para pacientes e portadores menores de idade) autorizaram a criopreservação do material biológico no termo de consentimento. O estudo já foi aprovado pelo Comitê de ética do HUPES/UFBA (Registro da CONEP n° 13097) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos pacientes foram registrados em um banco de dados (Microsoft Excel 2013) e analisados com o programa GraphPad Prism v. 5.02 para a avaliação estatística. A comparação de dados entre dois grupos foi realizada através do teste de Mann-Whitney U e para a correlação de variáveis entre grupos foi utilizado o teste de Spearman's rank. Uma probabilidade de $p \leq 0,05$ foi considerada significativa.

5. RESULTADOS

5.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram incluídos no estudo 36 pacientes com diagnóstico de ATL seguindo critérios clínico-patológico estabelecidos (SHIMOYAMA *et al.*, 1991; BITTENCOURT *et al.*, 2007) tendo sido acompanhados no Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia (C-HUPES/UFBA). Foram estudados os pacientes nas diferentes formas clínicas como descrito na tabela 7.

Também foram incluídos 17 portadores assintomáticos adultos do HTLV-1, acompanhados no mesmo hospital e não mostraram aspectos relacionados com manifestações de ATL, DIH ou HAM/TSP (Tabela 8)

Foram incluídos também 37 pacientes de DIH (Tabela 9) acompanhados nos Serviços de Dermatologia e Neuropediatria do C-HUPES e diagnosticados segundo critérios pré-estabelecidos (La Grenade *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2005, Oliveira *et al.*, 2012) pelo Grupo de Pesquisa das manifestações infantojuvenis da infecção pelo HTLV-1 (UFBA/FIOCRUZ).

Foram incluídos ainda 14 portadores assintomáticos do HTLV-1 da faixa infantojuvenil que também não mostraram aspectos relacionados com manifestações de ATL, DIH ou HAM/TSP (Tabela 10), que faziam parte da coorte. Todos os casos tiveram sorologia negativa para HIV e positiva para HTLV-1 por *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e esses resultados foram confirmados por *western blot* e ou PCR.

Apesar de se tratar de uma coorte de acompanhamento, foi selecionada apenas uma amostra de cada paciente, para dessa mesma amostra realizar a extração de DNA e RNA, portanto desenvolvendo-se um estudo de corte transversal em amostras de conveniência. O cálculo amostral foi realizado com o programa WinPepi v. 11.60 (Copyright J.H. Abramson), utilizando parâmetros de prevalência da infecção de doadores de banco de sangue do país (GESSAIN e CASSAR, 2012).

Tabela 7: Características dos Pacientes de ATL estudados nas diferentes formas clínicas

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS
Total de pacientes	36
Sexo – n° (%)	
Masculino	18 (50)
Feminino	18 (50)
Formas clínicas (%)	
Aguda	11 (30,5)
Linfoma	6 (16,6)
Crônica	8 (22,2)
<i>Smoldering</i> (SM)	8 (22,2)
Tumoral primária de pele (TC)	3 (8,3)

Tabela 8: Portadores assintomáticos adultos

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS
Total de portadores assintomáticos	17
Mediana de idade (anos)	46
Sexo – n° (%)	
Masculino	06 (35,3)
Feminino	11 (64,7)

Tabela 9: Características dos Pacientes de DIH estudados.

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS
Total de pacientes	37
Sexo – n° (%)	
Masculino	14 (37,8%)
Feminino	23 (62,1%)
Associação com HAM/TSP – n° (%)	
(+)	11 (29,7%)
(-)	26 (70,2%)

Tabela 10: Portadores assintomáticos da faixa infantojuvenil.

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS
Total de portadores assintomáticos	14
Mediana de idade (anos)	11
Sexo – n° (%)	
Masculino	09 (64,2%)
Feminino	06 (42,8%)

6. EXPRESSÃO DOS GENES *p12*, *p13* E *p30* EM PACIENTES COM ATL E EM PORTADORES ASSINTOMÁTICOS ADULTOS.

Nos pacientes de ATL, observou-se maiores níveis de expressão do transcrito do gene *p12* que do transcrito dos genes *p13* ($p=0,0020$, teste Mann Whitney) e *p30* ($p=0,0003$, teste Mann Whitney) (Figura 9A). Porém, os níveis de expressão dos genes *p13* e *p30* foram similares ($p=0.1025$, teste Mann Whitney).

Em portadores assintomáticos adultos, também foi observada uma maior expressão do gene *p12* a respeito do gene *p13* ($p=0.0015$, teste Mann Whitney) e do gene *p30* ($p=0.0201$, teste Mann Whitney). Como observado nos pacientes de ATL, os níveis de expressão para os genes *p13* e *p30* foram similares ($p=0.2275$, teste Mann Whitney (Figura 9B).

Quando comparados os dois grupos, foram observados menores níveis de expressão do gene *p12* e *p30* nos pacientes de ATL que nos assintomáticos adultos ($p=0.0015$ para o

transcrito de *p12* e $p=0.0201$ para o transcrito de *p30*). Os valores de expressão do gene *p13* foram similares entre pacientes de ATL e portadores assintomáticos (Figura 9C).

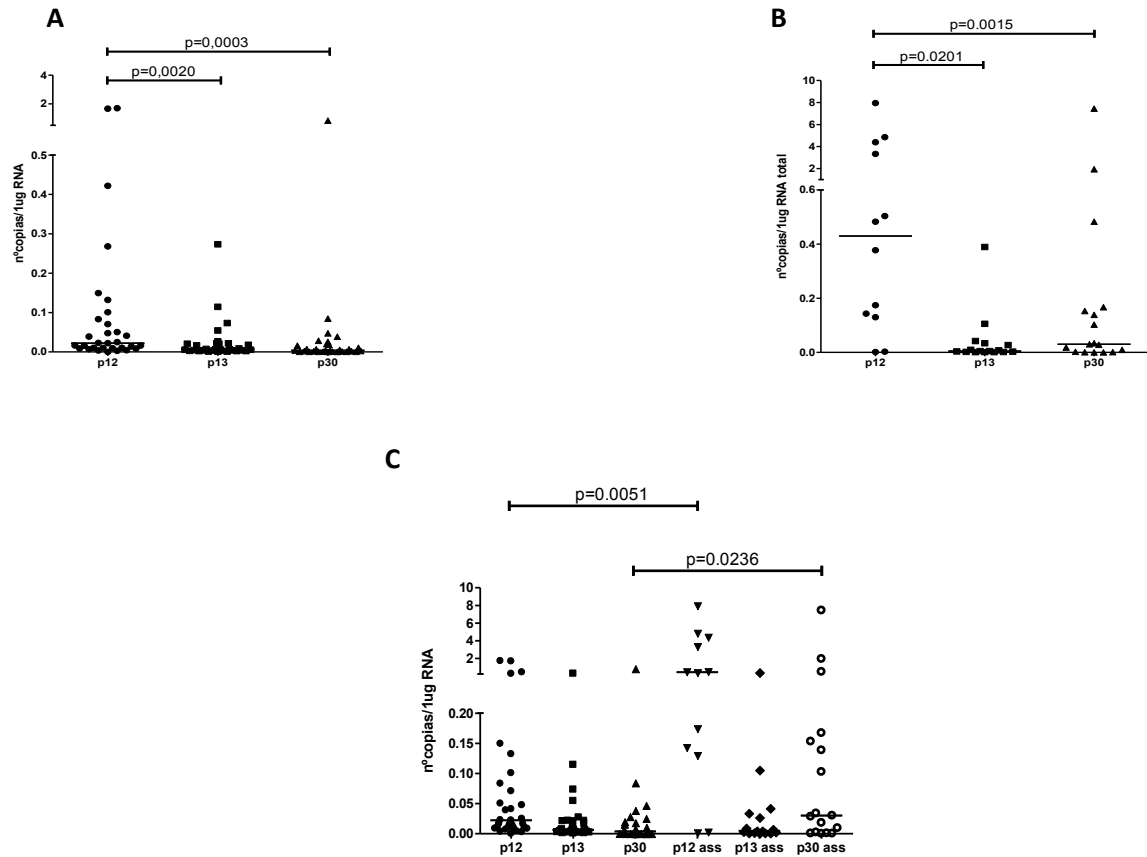


Figura 9: Níveis de expressão dos genes *p12*, *p13* e *p30* em pacientes com ATL (A), em portadores assintomáticos (B) e em comparação entre os dois grupos (C)

6.1 EXPRESSÃO DOS GENES *p12*, *p13* E *p30* NAS DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA ATL E EM ASSINTOMÁTICOS ADULTOS

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os níveis de expressão dos três genes estudados nas diferentes formas clínicas de ATL (figura 10A, B e C). Quando comparadas as diferentes formas clínicas com os portadores assintomáticos adultos para o gene *p12*, foram observados menores níveis de expressão nas formas aguda ($p=0.0337$), smoldering ($p=0.0201$) e linfoma ($p=0.0338$) e similares para a forma crônica. Não houve diferenças entre os níveis de expressão do gene *p13* entre as diferentes formas clínicas e os portadores assintomáticos adultos. Para o gene *p30*, todas as formas clínicas também apresentaram valores similares de expressão que os portadores assintomáticos exceto a forma aguda, que mostrou menores níveis de expressão ($p=0.0164$).

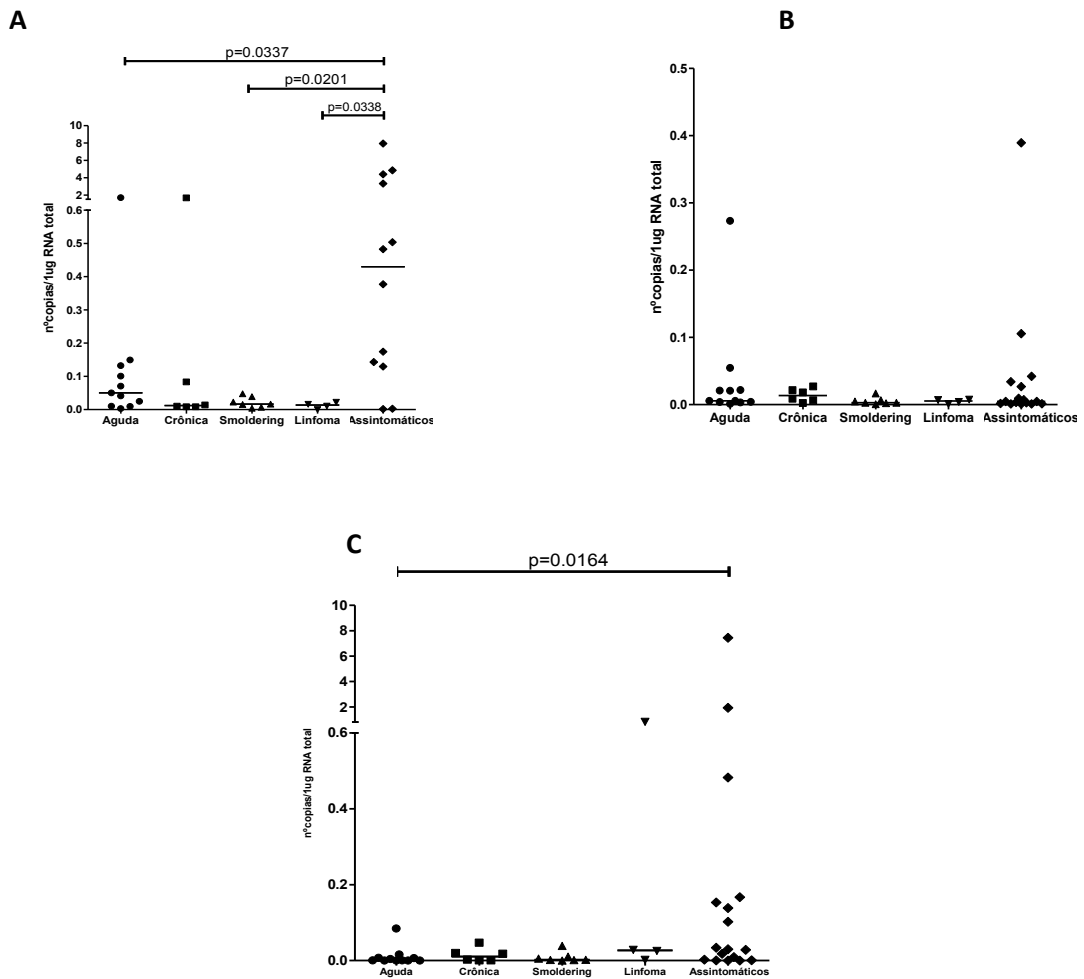


Figura 10: Níveis de expressão dos genes *p12*(A), *p13*(B) e *p30*(C) nas diferentes formas clínicas da ATL e portadores assintomáticos adultos.

Quando os valores de expressão destes genes virais nas diferentes formas clínicas foram divididos pela carga proviral, o que aproxima a um valor de expressão por célula infectada, foram observados valores similares entre os grupos. Somente observou-se menor expressão para o gene *p30* (Figura 11C) na forma aguda a respeito da linfoma ($p=0.0430$). Comparando estes valores com os dos assintomáticos, também normalizados pela carga proviral, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (Figura 11).

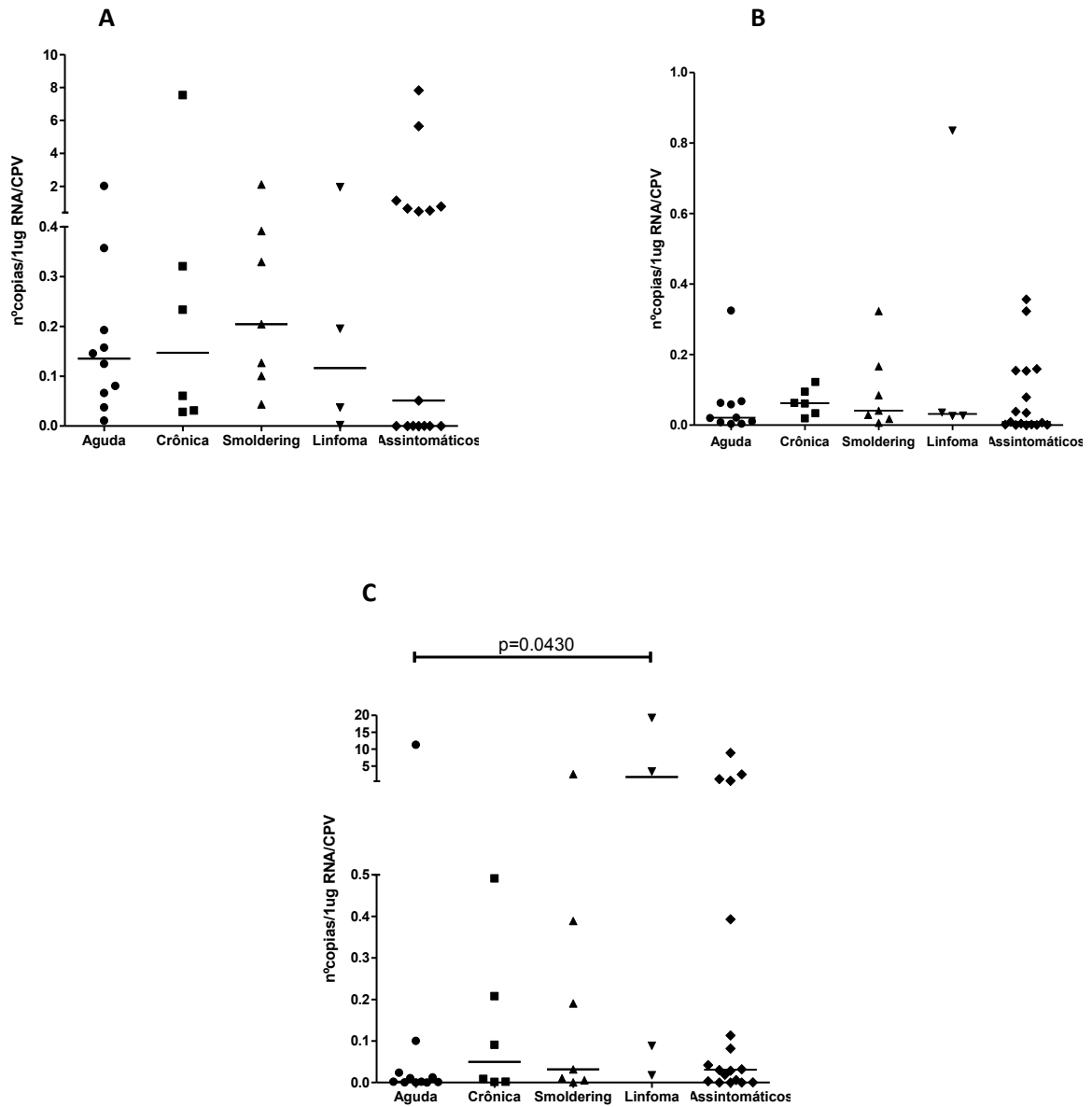


Figura 11: Níveis de expressão dos genes *p12*(A), *p13*(B) e *p30*(C) nas diferentes formas clínicas da ATL e portadores assintomáticos adultos com os dados normalizados pela carga proviral.

6.2 CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS *p12*, *p13* E *p30* NOS PACIENTES DE ATL E NOS PORTADORES ASSINTOMÁTICOS ADULTOS.

Análises de correlação entre os níveis de expressão dos genes virais foram realizadas e verificou-se nos pacientes de ATL, uma correlação positiva entre os níveis de expressão de *p12* e *p13* ($p=0.0128$, $r=0,4641$, teste Spearman r). Porém, não houve correlação nos níveis de expressão destes genes com o gene *p30*. Nos assintomáticos, não houve correlação entre a expressão destes genes virais.

6.3 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS *p12*, *p13* E *p30* E A CPV NOS PACIENTES DE ATL E NOS PORTADORES ASSINTOMÁTICOS.

A expressão dos três genes virais correlacionou com a carga proviral nos pacientes de ATL. Foi uma correlação positiva para os genes *p12* ($p=0.0341$, $r=0.4090$) e *p30* ($p<0.0001$, $r=1.000$) enquanto que para o gene *p13* foi negativa ($p=0.0076$, $r=-0.5024$). Nos portadores assintomáticos, não observou-se essas correlações.

7. EXPRESSÃO DOS GENES *p12*, *p13* E *p30* EM PACIENTES E EM PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DA FAIXA ETÁRIA INFANTO-JUVENIL INFECTADOS PELO HTLV-1.

Nos pacientes de DIH, encontrou-se uma maior expressão de *p12* que *p30*, em dados normalizados pelo controle constitutivo ($p=0.028$). Como na ATL, as análises não mostraram diferenças significantes entre a expressão de *p12* e *p13* ou *p13* e *p30* (Figura 12A).

Avaliou-se a expressão dos genes *p12*, *p13* e *p30* nos portadores assintomáticos do HTLV-1 da faixa infantojuvenil e verificou-se que os níveis de mRNAs encontrados são similares nestes indivíduos (Figura 12B)

Nesta análise, foram incluídos todos os indivíduos com DIH e DIH/HAM/TSP para comparação dos níveis de expressão com os portadores assintomáticos. Observou-se que os níveis de *p12* são maiores (Figura 12) nos indivíduos com doença associada ao vírus, que nos portadores assintomáticos ($p=0.0437$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para *p12* e *p13*. (Figura 12C).

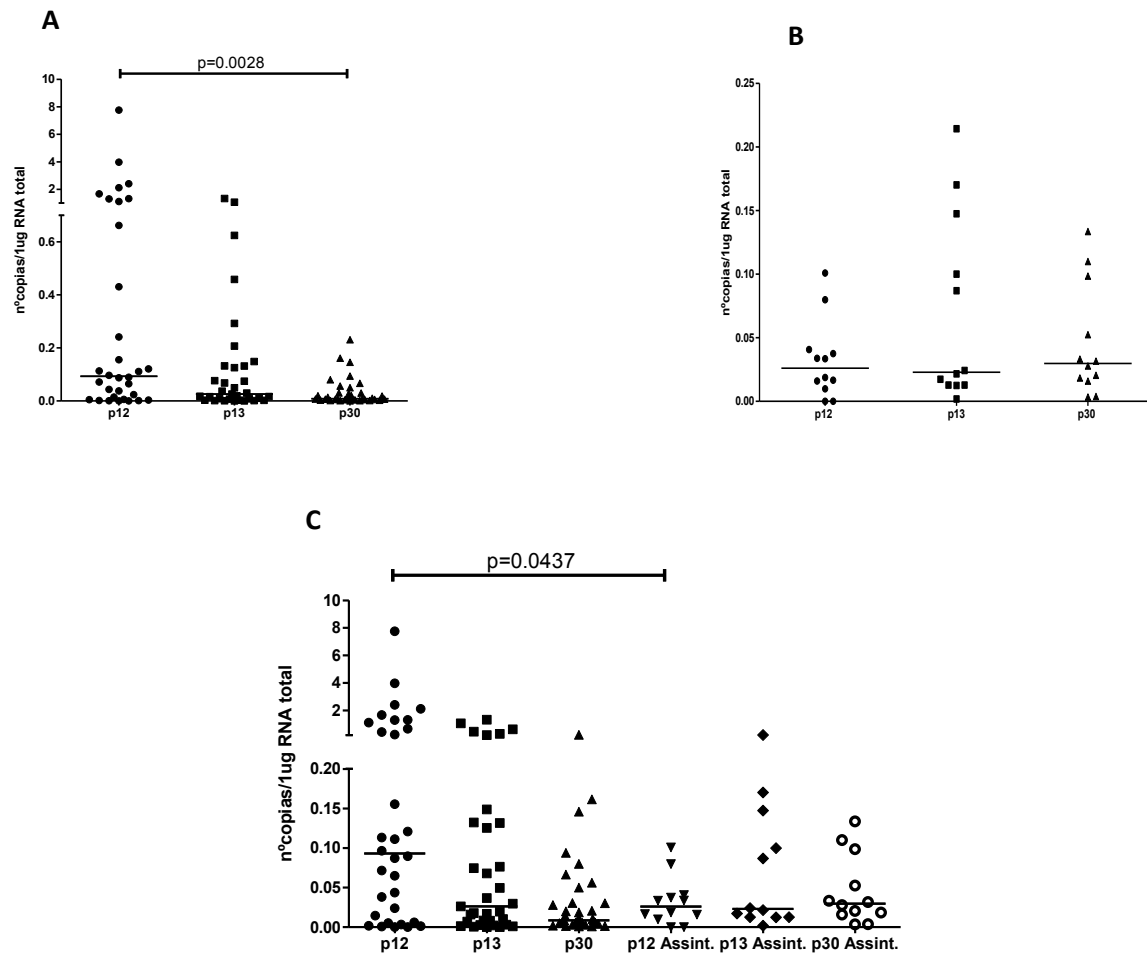


Figura 12: Comparação dos níveis de expressão dos genes *p12*, *p13* e *p30* em pacientes de DIH em geral(A), portadores assintomáticos(B) e comparação entre os dois grupo(C).

7.1 EXPRESSÃO DOS GENES *p12*, *p13* E *p30* NOS DIFERENTES GRUPOS DOS INDIVÍDUOS DA FAIXA ETÁRIA INFANTOJUVENIL.

Realizou-se estratificação dos pacientes de DIH segundo a associação ou não com mielopatia, e portadores assintomáticos da mesma faixa etária não foram detectadas diferenças na expressão de *p12* (Figura 13A) e *p13* (Figura 13B) entre os grupos analisados. Somente na análise da expressão de *p30*, observou-se diferença estatisticamente significativa (p=0.0031) entre o grupo de pacientes com DIH e portadores assintomáticos (Figura 13 C).

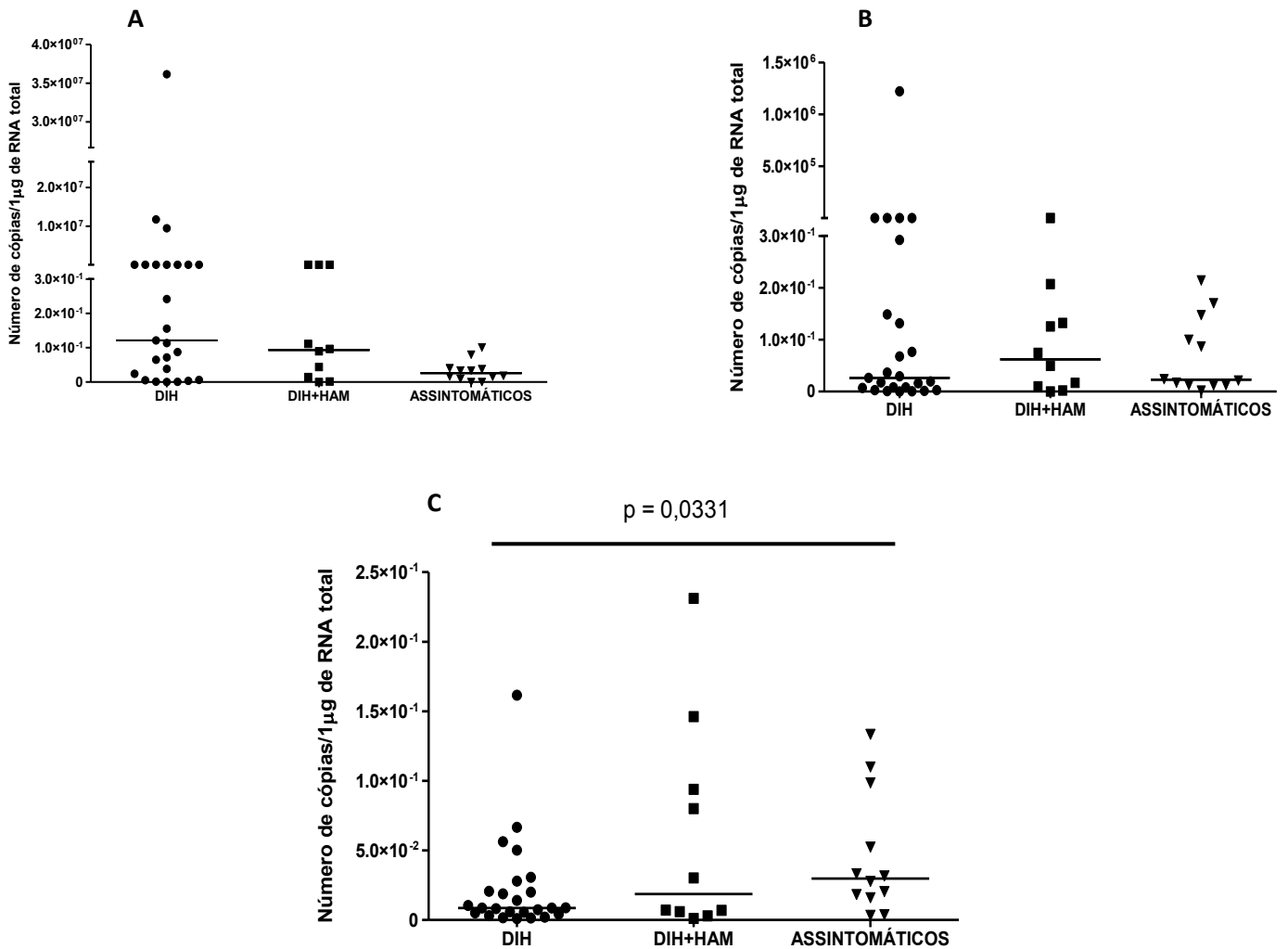


Figura 13: Níveis de Expressão dos genes *p12* (A), *p13* (B) e *p30* (C) nos diferentes grupos da faixa- etária infanto-juvenil do HTV-1.

7.2 CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS *p12*, *p13* E *p30* NOS PACIENTES COM DIH E DIH/HAM/TSP E PORTADORES ASSINTOMÁTICOS.

Observou-se uma correlação positiva da expressão dos genes *p12* e *p13* em pacientes com DIH ($p < 0.0001$, $r = 0.0868$). Em pacientes que apresentavam associação da DIH com a HAM/TSP, observou-se também uma correlação positiva entre esses genes ($p = 0.0234$). Nos portadores assintomáticos não houve correlações entre os genes estudados.

7.3 CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS *p12*, *p13* E *p30* E A CPV NOS PACIENTES COM DIH E DIH/HAM/TSP E PORTADORES ASSINTOMÁTICOS.

Avaliou-se a correlação entre a expressão de *p12*, *p13* e *p30* e a CPV. Observou-se que os níveis de expressão de *p13* correlacionaram com a carga proviral, nos grupo de pacientes com doença, mas não houve essa correlação entre *p12* e *p30*. No grupo de portadores assintomáticos não houve correlação entre a carga proviral e a expressão dos genes estudados.

8. EXPRESSÃO DOS GENES *HBZ* (TRANSCRITOS *HBZ* E *HBZ-SI*) E *tax* NOS PORTADORES DO HTLV-1 DA FAIXA INFANTOJUVENIL

8.1 EXPRESSÃO DOS GENES *HBZ* (TRANSCRITOS *HBZ* E *HBZ-SI*) E *tax* NOS PACIENTES DE DIH E COM MANIFESTAÇÃO SIMULTÂNEA DE DIH E HAM/TSP

Tanto nos pacientes com DIH, quanto nos pacientes com DIH e HAM/TSP, verificaram-se maiores níveis de expressão do transcrito *HBZ-SI* em relação ao transcrito *HBZ* ($p=0.0123$, $p=0.0147$). Observaram-se, também, maiores níveis de expressão de *HBZ-SI* com relação ao mRNA de *tax*, tanto nos pacientes apenas com DIH ($p<0.0001$), quanto nos pacientes com DIH e HAM/TSP ($p=0.0001$). O transcrito *HBZ* do gene *HBZ* também apresentou níveis de expressão maiores que o transcrito do gene *tax*, tanto nos pacientes de DIH ($p<0.0001$), quanto nos pacientes com DIH e HAM/TSP ($p=0.0011$), como mostra a Figura 14.

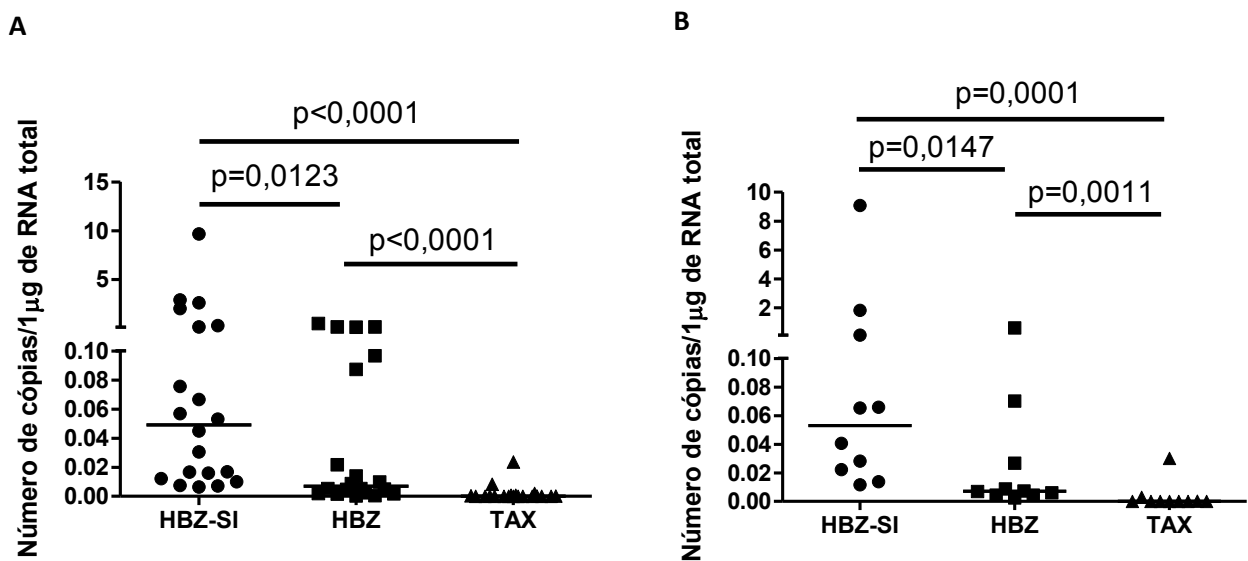


Figura 14: Expressão dos mRNAs dos genes *HBZ* e *tax* em pacientes da faixa infantojuvenil com DIH(A) e DIH com associação com HAM/TSP (B).

8.2 EXPRESSÃO DOS GENES *HBZ* (TRANSCRITOS *HBZ* E *HBZ-SI*) E *tax* NOS PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DO HTLV-1 NA FAIXA INFANTOJUVENIL.

Diferentemente dos pacientes de DIH, nos portadores assintomáticos da faixa infantojuvenil, verificaram-se níveis similares de expressão dos transcritos do gene *HBZ*. Já em comparação com o transcrito do gene *tax*, observaram-se maiores níveis de expressão dos dois transcritos do gene *HBZ*, com $p=0.0003$ para *HBZ-SI* e $p=0.0027$ para *HBZ* (Figura 15).

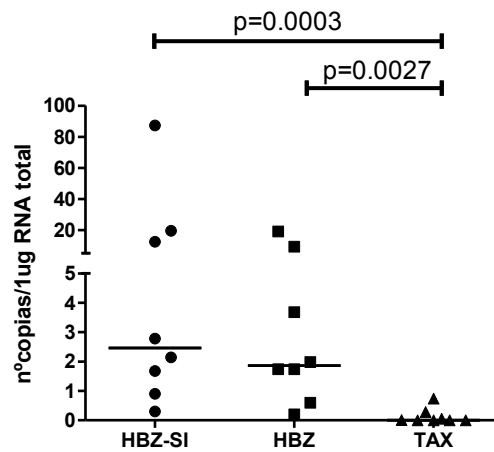


Figura 15: Expressão dos mRNAs dos genes *HBZ* e *tax* em portadores assintomáticos do HTLV-1 da faixa infantojuvenil.

8.3 COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS *HBZ* E *tax* NOS DIFERENTES GRUPOS DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1 NA FAIXA ETÁRIA INFANTOJUVENIL.

Foram realizadas análises comparativas para avaliar possíveis diferenças de expressão desses genes virais nos diferentes grupos de pacientes e portadores da faixa infantojuvenil, entretanto, não foram detectadas diferenças na expressão dos genes *HBZ* e *tax* entre os diferentes grupos de indivíduos (Figura 16).

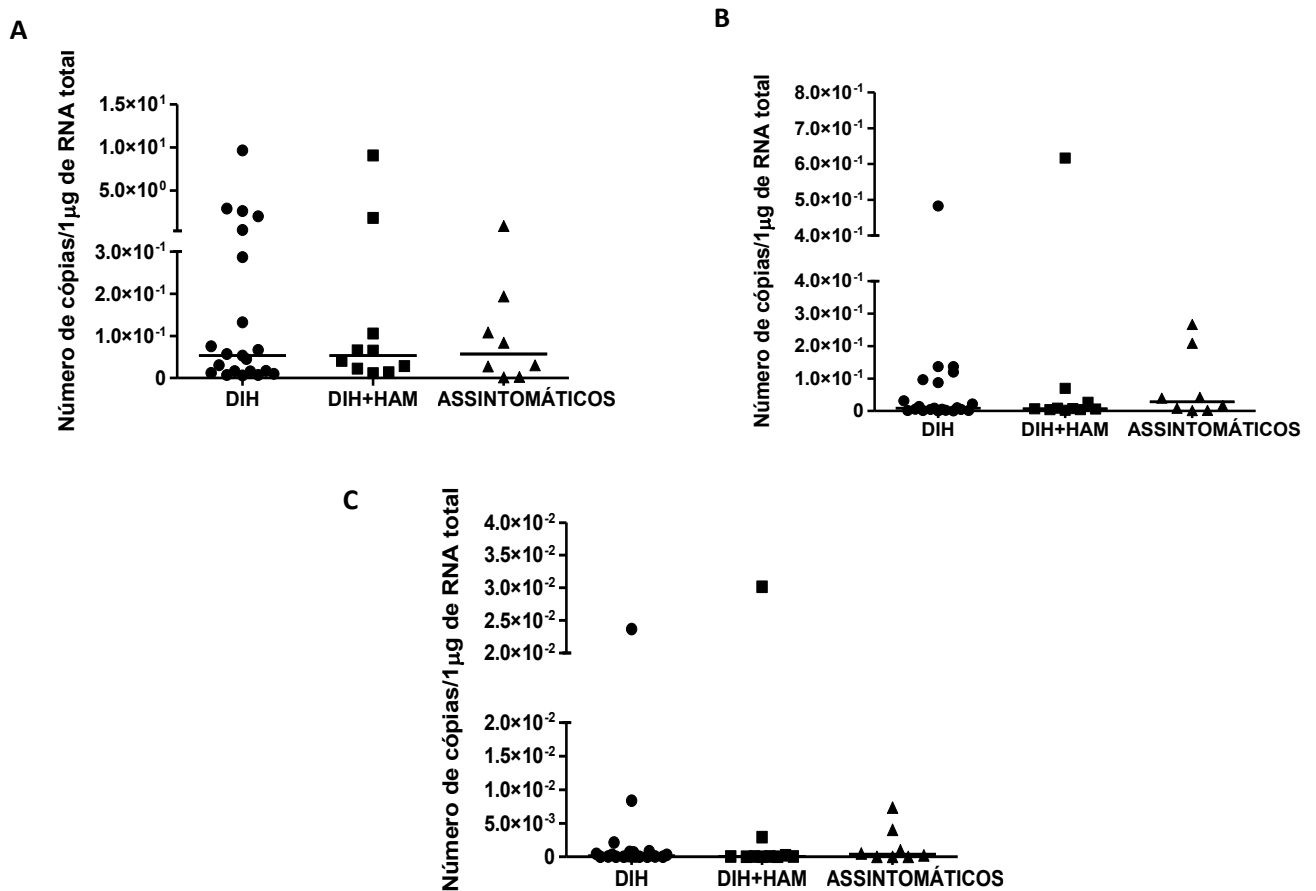


Figura 16: Avaliação intergrupos da expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nos indivíduos da faixa infantojuvenil infectados pelo HTLV-1. Níveis de expressão do transcrito HBZ-SI (A), níveis de expressão do transcrito HBZ (B) e níveis de expressão de *tax* (C).

8.4 CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS *HBZ* E *tax* NOS PACIENTES DE DIH E PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DA FAIXA ETÁRIA INFANTOJUVENIL.

A expressão dos transcritos do gene *HBZ*, HBZ-SI e HBZ, correlacionou de forma positiva ($p < 0,0001$, $r = 0,8121$, teste Spearman r) o que ocorreu também na análise desses transcritos com o transcrito do gene *tax* onde a correlação com HBZ-SI teve $p = 0,0014$ e $r =$

0.5488 e com HBZ, $p=0.0001$ e $r= 0.6403$, teste Spearman r . Não houve correlação da expressão destes genes em portadores assintomáticos.

8.5 CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES *HBZ* E *tax* COM A CPV NOS PACIENTES DE DIH E PORTADORES ASSINTOMÁTICOS DA FAIXA ETÁRIA INFANTOJUVENIL

Houve correlação positiva apenas entre os níveis de expressão de HBZ-SI e a CPV dos indivíduos com DIH ($p=0.0479$, $r= 0.4078$ Spearman r), no grupo de DIH. Nos indivíduos DIH/HAM e portadores assintomáticos, não houve qualquer relação da expressão de *HBZ* e *tax* com a CPV.

9. COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE *p12*, *p13* E *p30* NA DIH E ATL

Para essa análise, foram utilizadas todas as amostras de DIH, DIH/HAM/TSP e todas as amostras de ATL sem estratificação verificou-se níveis maiores níveis de expressão de *p12*(Figura 17A) nos assintomáticos adultos que nos assintomáticos da faixa infantojuvenil ($p=0.0029$), maiores níveis de expressão de *p13*(Figura 17B) no grupo de DIH/HAM que nos pacientes com ATL ($p=0.0468$) e assintomáticos infanto-juvenís maiores que assintomáticos adultos ($p=0.0274$) e maiores níveis de *p30* em assintomáticos adultos que assintomáticos da faixa etária infantojuvenil ($p=0.0029$), como se observa na Figura 17C.

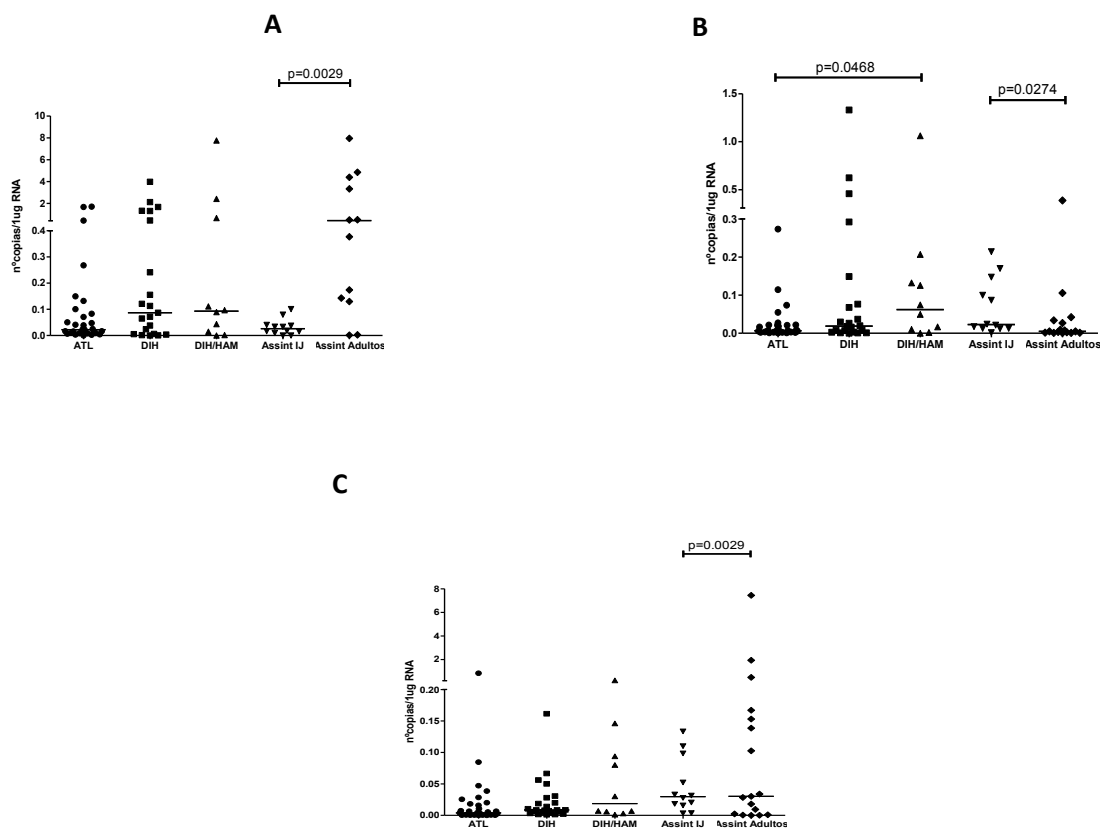


Figura 17: Níveis de expressão de mRNAs de *p12* (A), *p13* (B) e *p30*(C) em grupos de indivíduos de diferentes faixas etárias e com distintas patologias associadas à infecção pelo HTLV-1

10. DISCUSSÃO

EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS DA REGIÃO *PX* NA ATL

Nos pacientes com ATL em geral e nos portadores assintomáticos adultos, verificou-se maior expressão de *p12* em relação à *p13* e *p30*. Quando se comparou os grupos de ATL e portadores assintomáticos, observou-se uma maior expressão de *p12* e *p30* nos assintomáticos que nos indivíduos com ATL, sugerindo uma importante ativação desse gene nos indivíduos sem doença, não sendo, portanto, a sua expressão, um fator determinante para a manifestação da ATL e talvez mais importante para os períodos de latência viral. Pode-se justificar maiores níveis de *p12* em relação a *p13* e *p30* pelo fato desse gene codificar para duas proteínas virais: *p12* e *p8* que desempenham importante atividade nos mecanismos de escape viral do sistema imunológico (FUKUMOTO *et al.*, 2009).

A correlação positiva entre os níveis de expressão de *p12* e *p13* mostra que os indivíduos que apresentam níveis de *p12* elevado, também apresentam níveis de *p13* elevado, sugerindo que os mecanismos de regulação da transcrição destes dois genes são os mesmos ou estão relacionados.

Apesar de dados da literatura mostrarem que *p13* apresenta funções mais relacionadas com as funções de *p30*, os níveis de expressão desses genes não apresentaram correlação positiva (NICOT e BAI, 2012). Pode-se tratar de funções redundantes.

A análise da expressão em diferentes formas clínicas da ATL mostrou maior expressão de *p12* em assintomáticos que em quatro das cinco formas clínicas. Isso pode ser justificado pelo fato de que as células ATL já possuem capacidade de proliferação e escape do sistema imunológico pela baixa ou nenhuma expressão de *tax*, causada pelo *HBZ*, não havendo necessidade, portanto, da atuação dessa proteína. Essa diferença não ocorreu para *p13* nas diferentes formas clínicas de ATL e em relação aos assintomáticos, sugerindo que os níveis de expressão desse gene são similares nos indivíduos adultos portadores do vírus e levantando a questão de quando ele seria mais ou menos expresso no curso da patogênese viral. O gene *p13* tem o papel de controlar a proliferação das células infectadas, inibindo a formação do complexo Tax-CBP/p300, responsável pela ativação da transcrição do provírus. (NICOT e BAI, 2012).

Observou-se uma maior expressão de *p30* na forma clínica linfomatosa do que na forma aguda, porém esses dados precisam ser analisados juntamente com níveis de expressão

da proteína codificada por este gene, nesse pacientes, pois p30 parece ter um papel importante no controle do ciclo celular, normalmente inibindo sua progressão, e na apoptose (DATTA *et al.*, 2007), contribuindo para a transformação das células infectadas pelo HTLV-1. Parece haver uma associação importante desse gene também na redução da expressão de TLR4, o que favorece infecções oportunistas nesses pacientes (DATTA *et al.*, 2006).

Foram detectadas correlações positivas entre os níveis de expressão de *p12* e *p13*, mas nenhuma correlação destes genes com *p30*. A literatura mostra que a expressão combinada das proteínas p12 e p13 aumenta a quantidade e a duração do cálcio citosólico em resposta à estimulação dos TCRs (*T cell receptor*), resultando na ativação acentuada de NFAT (SILIC-BENUSSI, M., *et al.*, 2010).

Na ATL, a CPV correlacionou-se positivamente com a expressão de *p12* e *p30* e negativamente com *p13*, sugerindo existir uma maior quantidade de células infectadas expressando mais mRNAs de *p12* e *p30* que *p13*. Nenhuma correlação foi encontrado nos portadores assintomáticos. Em trabalhos prévios, verificou-se também a correlação positiva da carga proviral com outros dois genes da região *pX*: os genes *tax* e *HBZ*, evidenciando que a expressão dos genes dessa região é fundamental para os mecanismos de patogênese viral na ATL e que a CPV, pode ser um indicador de expressão gênica de *pX* nesses indivíduos (ARCHANJO, I. *et al.*, comunicação interna).

EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS NA FAIXA INFANTOJUVENIL

Os pacientes de DIH em geral, apresentaram maiores níveis de expressão do gene *p12* e menores de *p30* quando comparados com os portadores assintomáticos infanto-juvenis. O mesmo foi observado na ATL, indicando que esse gene é expresso sempre em maiores níveis que *p30* e sugerindo sua atuação em diferentes momentos da infecção para que as células infectadas escapem do sistema imunológico (FUKUMOTO *et al.*, 2009). Parece ainda haver um contrabalanço na expressão desses genes ou de outros genes virais relacionados a eles, já que seus níveis são encontrados com diferenças estatisticamente significantes em fases distintas da infecção.

Observou-se que *p12* foi mais expresso em pacientes, sem estratificação de grupos, que nos portadores assintomáticos, sugerindo uma maior atuação deste gene na DIH do que na ATL, onde se verificou o contrário. A expressão desses genes parece, portanto, variar ao

longo do curso da infecção, indicando que diferentes etapas ou diferentes manifestações clínicas dependem da sua ativação ou inibição. Não existem dados na literatura a respeito da expressão de *p12* em indivíduos da faixa etária infanto-juvenil, mas suas funções são importantes para o eficiente estabelecimento e manutenção da infecção *in vitro* e *in vivo* (VALERIO, W.V. *et al.*, 2010).

Quando a estratificação foi realizada, separando os grupos de DIH e DIH/HAM/TSP, não foram observadas diferenças na expressão de *p12* e *p13*, portanto, maiores níveis da expressão destes genes parecem não estar associados com uma doença em específico na infância. Para essa comprovação, o ideal, seria incluir um grupo de pacientes apenas com HAM/TSP nessa faixa etária. Os níveis de *p30*, em contrapartida, foram superiores nos pacientes com DIH, em relação aos assintomáticos. A proteína codificada por esse gene é fundamental para a propagação viral *in vivo* (ALBRECHT, B., LAIRMORE, M.D., 2002), porém não existem dados sobre seu papel nas etapas mais iniciais da infecção viral e seus níveis de expressão altos podem indicar atividade importante nessas etapas. Estudos funcionais em células de pacientes com DIH, avaliando a ação da proteína, são necessários para avaliar suas ações.

Como na ATL, houve correlação entre a expressão de *p12* e *p13* e isso pode estar relacionado com o mecanismo de cálcio para ativação de fatores de transcrição (SILIC-BENUSSI, M., *et al.*, 2010), sendo um mecanismo importante inclusive nas fases mais iniciais de infecção.

No presente estudo, a expressão do gene *HBZ* também foi maior que a expressão do gene *tax* nos pacientes de DIH e nos portadores assintomáticos, o que sugere que o gene *HBZ* tem um papel mais importante na patogênese da DIH que o gene *tax*, como parece ser para a ATL e HAM/TSP (SATOUE *et al.*, 2006, MATSUOKA e GREEN, 2009). O gene *HBZ* produz dois transcritos, o *HBZ-SI* e o *HBZ* (MURATA *et al.*, 2005; GAUDRAY *et al.*, 2002). Os níveis de transcrição de cada um dos transcritos foram maiores do que os níveis de transcrição do gene *tax*.

Na literatura se sugere que a expressão do gene *HBZ* acontece para contrabalancear a expressão e ações do gene *tax* e deste modo, seria esperado observar uma correlação negativa e não positiva. A proteína *HBZ*, e não o mRNA, tem capacidade de regular a transcrição viral mediada por *Tax* (SATOUE *et al.*, 2006) através do promotor 5'LTR.

Foi interessante observar que a expressão dos dois transcritos do gene *HBZ* correlacionou positivamente com a expressão do gene *tax* o que indica que aqueles pacientes que tem altos níveis de transcrição de *HBZ* também tem altos níveis de expressão de *tax*. Na literatura se sugere que mRNA do gene *HBZ* inibiria a expressão do gene *tax*, deste modo, era esperado observar uma correlação negativa entre a expressão destes genes. Na ATL, observou-se resultado semelhante na correlação de *HBZ* e *tax*, mas não de *HBZ-SI* e *tax* (Archanjo, I., comunicação pessoal). É possível, portanto, que nas fases mais tardias, em pacientes com ATL, por exemplo, que *HBZ-SI* passe a se expressar mais e reduzir significativamente a quantidade de *tax*.

Observou-se, nos pacientes de DIH apenas a correlação positiva do *HBZ-SI* com a CPV, Usui e col, 2008, observaram nos pacientes de ATL uma correlação positiva entre a carga proviral e a expressão do *HBZ-SI* mRNA. Nesse caso, a expressão do transcrito *HBZ-SI* aumentava com o número de células infectadas. Essa correlação não foi positiva para o gene *tax*, mostrando que *HBZ-SI* tem fundamental papel na supressão desse gene e na proliferação das células infectadas, uma vez que a carga proviral se mantém, mesmo com a baixa expressão de *tax*.

COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *p12*, *p13* E *p13* NAS DIFERENTES FASES DA INFECÇÃO

A expressão de *p12* foi estatisticamente maior nos assintomáticos adultos que nos infantojuvenis. A análise comparativa da expressão de *p30* nas distintas fases de infecção revelou que esse gene também se expressa mais em assintomáticos adultos indicando que estes genes são ativados em indivíduos não doentes, porém com maior tempo de convivência com o vírus. Já o gene *p13*, apresentou-se com maior expressão em pacientes DIH/HAM/TSP do que nos indivíduos com ATL e nos assintomáticos adultos que nos assintomáticos infantojuvenis, levantando a questão sobre em que período exatamente esse gene se expressa, pois na literatura não existem dados sobre quando *p13* é importante para os mecanismos de patogênese viral.

11. CONCLUSÕES

O HTLV-1 depende, dentre outros mecanismos e fatores, da expressão de genes virais da região pX para sua manutenção dentro do indivíduo infectado. Pacientes com pouco tempo de convivência com o vírus já expressam transcritos destes genes, o que evidencia seus importantes papéis na patogênese viral.

É importante ressaltar que mecanismos e características do hospedeiro também interferem na manifestação de doenças e progressão das mesmas.

A expressão de *p12* foi alta na maior parte dos indivíduos estudados, quando em comparação com *p13* e *p30* e que a expressão de *HBZ* foi sempre maior que a expressão de *tax* nos indivíduos da faixa etária infantojuvenil. Esses dados podem auxiliar no direcionamento de outros estudos de expressão gênica e protéica viral e na associação desses resultados com manifestações de fases iniciais ou tardias da infecção.

A quantificação dos mRNAs apenas é insuficiente para compreender todo o mecanismo viral, pois deve-se levar em consideração as modificações pós-transcricionais e pós-traducionais dos produtos dos genes virais. Portanto, estudos funcionais, devem ser elaborados, no sentido de elucidar melhor como os genes, mRNAs e proteínas virais trabalham e influenciam na persistência da infecção.

12. REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, B., Lairmore, M.D. Critical role of human T-lymphotropic virus type 1 accessory proteins in viral replication and pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol.**, v. 66, p.396–406, 2002.
- ANDRESEN, V., *et al.* Suppression of HTLV-1 replication by Tax-mediated rerouting of the p13 viral protein to nuclear speckles. **Blood**, v. 118, n. 6, p. 1549-1559, 2011.
- AQUIJE, M. Ballona R. Dermatitis infecciosa asociada a HTLV-I em el Servicio de Dermatología del instituto de la Salud del Niño. *Folia Dermatol. Peruana*, v. 13, p.1-8, 2002.
- ARISAWA, K. *et al.* Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan. **Int. J. Cancer**, v. 85, n. 3, p. 319-324, 2000.
- BANGHAM, CR. The Immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. **J. Gen. Virol.**, v. 84, p. 3177-3189, 2003.
- BARBOSA, HS. Linfomas e leucemias associados à infecção pelo HTLV-I no Estado da Bahia 1997. 124p. [Tese]. Universidade Federal da Bahia.
- BERNEMAN, ZN. *et al.*, Expression of alternatively spliced human T-Lymphotropic virus type I pX mRNA in infected cell lines and in primary uncultured cells from patients with adult T-cell leukemia/lymphoma and healthy carriers. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 3005-3009, 1992.
- BIASIOTTO, R. *et al.* The p13 protein of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) modulates mitochondrial membrane potential and calcium uptake. **Bioch. Biophys Acta**, v. 1797, n. 6-7, p. 945-95, 2010.
- BITTENCOURT, A. L. Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Bahia, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 9, p. 437-8, 2005.
- BITTENCOURT, A. L.; PRIMO, J.; DE OLIVEIRA, M.F. Manifestations of the human T-cell lymphotropic virus type I infection in childhood and adolescence. **J. Pediatr.**, v. 82, p. 411-420, 2006.
- BITTENCOURT, A. L. *et al.* Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Bahia, Brazil: analysis of prognostic factors in a group of 70 patients. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 128, p. 875-882, 2007.
- BITTENCOURT, A. L. e FARRE, L. Leucemia/linfoma de células T do adulto. **Rev. Anais Bras. Dermatol.**, v. 8, p. 351-359, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia do manejo clínico do paciente com HTLV**. Série Manuais. Brasília, 2004. Disponível em:

http://www.aids.gov.br/sites/default/files/Guia_de_manejo_clinico_do_paciente_com_HTLV.pdf. Acesso em: 02 jul 2012.

BURKE, D.S. Recombination in HIV: An important evolutionary strategy. **Emergent Infectious Diseases**, v.3, p.253-258, 1997.

CATALAN-SOARES, B. C.; CARNEIRO-PROIETTI A. B. F.; PROIETTI F. A..Heterogenous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II(HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood from large urban areas in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 3, p. 926-931, 2005.

CIMINALE, V. Mitochondrial targeting of the p13II protein coded by the x-II ORF of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Oncogene**, v.18, p. 4505-4514, 1999.

DATTA, A., *et al.* The HTLV-I p30 Interferes with TLR4 Signaling and Modulates the Release of Pro- and Anti-inflammatory Cytokines from Human Macrophages. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 281, p. 23414-23424, 2006.

DATTA, A., *et al.* Human T-lymphotropic virus type-1 p30 alters cell cycle G2 regulation of T lymphocytes to enhance cell survival. **Retrovirology**, v.4, p. 49, 2007.

DING, W. *et al.* Endoplasmic Reticulum and *cis*-Golgi Localization of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 p12I: Association with Calreticulin and Calnexin. **J Virol**, v.75(16), p. 7672–7682, 2001.

DING, W. *et al.* Human T-cell lymphotropic virus type 1p12I enhances interleukin-2 production during T-cell activation. **Journal of Virology**, v. 77, p.11027-11039, 2003.

DOURADO, I. *et al.* HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 34, n, 5, p. 527-531, 2003.

EDWARDS, D, *et al.* HTLV-1 *Orf-I* and *Orf-II*-Encoded Proteins in Viral Infection and Persistence. **Viruses**, v.3, 2011.

FARRE, L. *et al.* Early sequential Development of Infective Dermatitis, Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1- Associated Myelopathy, and Adult T Cell Leukemia/Lymphoma. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p.440-442, 2008

FIGUEIRÓ-FILHO, EA, *et al.*, Infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas e transmissão vertical em gestantes de estado da Região Centro-Oeste do Brasil. Ver. **Bras. Ginecol. Obstet.**, v.27, p.719-25, 2005.

FRANCHINI, G. and H. Streicher. Human T-cell leukaemia virus. **Baillieres Clin Haematol**, v. 8, p. 131-148, 1995

- FUKUMOTO, R. *et al.* In vivo genetic mutations define predominant functions of the human T-cell leukemia/lymphoma virus p12I protein. **Blood**, v.113, p.3726- 3734, 2009.
- FUKUMOTO, R. *et al.* Inhibition of T-cell Receptor Signal Transduction and Viral Expression by the linker for activation of T cell-interacting p12 protein of Human T-cell Leukemia/Lymphoma Virus Type 1. **Journal of Virology**, v.81, p.9088-9099, 2007.
- GAUDRAY, G. *et al.* The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type I RNA genomes encodes a bzip transcription factor that down-regulates viral transcription. **The Journal of Virology**, v. 76, p. 12813-12822, 2002.
- GESSAIN, A. and CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Frontiers in Microbiology**, v.3, 2012
- GOFF, S.P. Intracellular trafficking of retroviral genomes during the early phase of infection: viral exploitation of cellular pathways. **J Gene Med**, v.3, p.517-528, 2001.
- GONÇALVES, D. U. *et al.* HTLV-I associated infective dermatitis may be an indolent HTLV-I associated lymphoma. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 4, p. 100-102, 2000.
- HANCHARD, B. *et al.*, Childhood infective dermatitis evolving into adult T-cell leukemia after 17 years. **The Lancet**, v. 338, p. 1593-1594, 1991.
- ISHAK, R. *et al.*, The epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infections among Indian populations of the Amazon region of Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, p.901-914, 2003.
- JACOB, F. *et al.*, Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of Sao Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 49(6), p.361-364, 2007.
- JEFFERY, K. J. *et al.* HLA alleles determine human T-lymphotropic virus - I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I associated myelopathy. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 96, p. 3848-3853, 1999.
- KANNAGI, M *et al.* Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene 85 products by human CD81 cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells. **Int Immunol**, v.3(8), p.761-767, 1991.
- KANNIAN, P., and Green, P. L. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. **Viruses**, v.2, p.2037-2077, 2010.
- KIM, S. *et al.*, Enhancement of LFA-1-Mediated T Cell Adhesion by Human T Lymphotropic Virus Type 1 p12. **J. Immunol**, v.176, p. 5463-5470, 2006.

KIRA, J. *et al.* Increased human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I proviral DNA in human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I associated myelopathy: a quantitative polymerase chain reaction study. **Annals of Neurology**, v. 29, p. 194-201, 1991.

KORALNIK, I. J., *et al.* Protein isoforms encoded by the pX region of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89(18), p.8813-8817, 1992.

KORALNIK, IJ; FULLEN, J; FRANCHINI, G. The p12I, p13II, and p30II proteins encoded by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I open reading frames I and II are localized in three different cellular compartments. **J Virol**, v.67, p. 2360-2366, 1993.

LA GRENADE L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **The Lancet**, v. 3361, p.345-7, 1990.

LA GRENADE, L. *et al.* Tropical spastic paraparesis occurring in HTLV-I associated infective dermatitis. Report of two cases. **West Indian Medical Journal**, v. 44, p. 34-35, 1995.

LA GRENADE L, Manns A, Fletcher V, Carberry C, Hanchard B, Maloney E, Cranston B, Williams NP, Wilks R, Kang EC, Blattner WA. Clinical, Pathologic, and immunologic features of human T-lymphotropic virus type I-associated infective dermatitis in children. **Archives of Dermatology**, v.134, p. 439-444, 1998.

LAIRMORE, M. D., *et al.* Molecular determinants of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and spread. **Viruses**, v.3(7), p. 1131-1165, 2011.

LAIRMORE, M. D., *et al.* Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. **Curr Opin Virol**, v. (4), p. 474-481, 2012.

LAROCCA, D. *et al.*, Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.163, p.1006-1013, 1989.

MACGILL, NK. *et al.*, HTLV-1-associated infective dermatitis: updates on the pathogenesis. **Experimental Dermatology**, v. 21, p. 815-821, 2012.

MAHÉ, A, *et al.*, Human T-cell leukaemia/lymphoma virus type 1-associated infective dermatitis in Africa: a report of five cases from Senegal. **British Journal of Dermatology**, v.150, p. 958-65, 2004.

MANEL, N; BATTINI, JL; TAYLOR, N; SITBON, N. HTLV-1 tropism and envelope receptor. **Oncogene**, v.24 (39), p. 6016-6025, 2005.

MATSUOKA, M. & JEANG, K.T. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infectivity and cellular transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 270-280, 2007.

- MATSUOKA, M. Human T-cell, leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology**, v. 2, p. 27, 2005.
- MESNARD, J.M. *et al.* HBZ, a new important player in the mystery of Adult T-cell Leukemia. **Blood**, v.108, p. 3979-3982, 2006
- MORENO-CARVALHO, O. A. *et al.* Evidence of preferential female prevalence of HTLV-I associated tropical spastic paraparesis in Bahia-Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 50, p. 183-188, 1992.
- MURATA, K, *et al.*, A novel alternative splicing isoform of human T-cell Leukemia Virus Type 1 bZIP Factor (HBZ-SI) Targets Distinct Subnuclear Localization. **Journal of Virology**, v. 80, p. 2495-2505, 2005.
- NAIR, A. *et al.*, Human T lymphotropic virus type 1 accessory protein p12I modulates calcium-mediated cellular gene expression and enhances p300 expression in T lymphocytes. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 21 p. 273–284, 2005.
- NAKAGAWA, M. HTLV-I associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. **Journal of NeuroVirology**, v. 1, p. 50-61, 1995.
- NASCIMENTO *et al.*, Infective dermatitis has similar immunological features to human T lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Clin Exp Immunol**, v.156, p. 455-462, 2009.
- NICOT, C. and Bai, X. T. Overview on HTLV-1 p12, p8, p30, p13: accomplices in persistent infection and viral pathogenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p.400, 2012.
- OLIVEIRA, M. F. P. *et al.* Infective dermatitis associated with the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Salvador, Bahia, Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 11, p. 90-96, 2005
- ORLAND, J. R. *et al.* Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV outcomes study. **Neurology**, v. 61, p. 1588-1594, 2003.
- OSAME, M. *et al.* HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **The Lancet**, 1986.
- 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**, v. 77, p. 7415–7419, 1980.
- PRIMO, J. R. *et al.* Infective dermatitis and juvenile HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p. 535-541, 2005;
- PRIMO J, Siqueira I, Nascimento MC, Oliveira MF, Farre L, Carvalho EM, Bittencourt AL. High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic

paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, p. 761-764, 2009.

PROIETTI, J. R. *et al.* Infective dermatitis and juvenile HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p. 535-541, 2005.

SAITO M, *et al.* In vivo expression of the *HBZ* gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Retrovirology**, v. 6, p.19, 2009.

SANTOS, J. I. *et al.* Seroprevalence of HIV, HTLV-I/II and other perinatally transmitted pathogens in Salvador, Bahia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 4, p. 343-348, 1995.

SATOU, Y. *et al.* HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 3, p. 720-725, 2006.

SHIMOYAMA, M. *et al.* Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. **British Journal of Hematology**, v.79, n.3, p. 428-437, 1991.

SILIC-BENUSSI, M., *et al.* Effects of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) p13 on mitochondrial K⁺ permeability: A new member of the viroporin family? **FEBS Lett**, v. 584(10), p. 2070-2075, 2010.

SILIC-BENUSSI, M., *et al.* HTLV-1 p13, a small protein with a busy agenda. **Mol Aspects Med** v. 31 p.350-358, 2010.

SLATTERY, JP; FRANCHINI, G; GESSAIN, A. Genomic Evolution, Patterns of Global Dissemination, and Interspecies Transmission of Human and Simian T-cell Leukemia/Lymphotropic. **Viruses Genome Res**, v.9, P.525-540, 1999.

SOARES, B. C. C.; CASTRO, M. S. M.; PROIETTI, F. A. Epidemiologia do HTLV I/II. **Cardenos Hemominas**, v. 11, p. 53-75, 2000.

SUITE M, Jack N, Basdeo-Maharaj K, Edwards J, White F, Blattner W, et al. Infective dermatitis in Trinidad and Tobago. **Aids Res Hum Retroviruses**, v.10, p. 447, 1994.

SWAINSON, L., *et al.* Glucose transporter 1 expression identifies a population of cycling CD4⁺ CD8⁺ human thymocytes with high CXCR4-induced chemotaxis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102(36), p.12867-12872, 2005.

SWEET RD *et al.*, A pattern of eczema in Jamaica. **British Journal of Dermatology**, v. 78, p. 93-100, 1966.

TAYLOR, J. M., *et al.* Genome wide analysis of human genes transcriptionally and post-transcriptionally regulated by the HTLV-I protein p30. **BMC Genomics**, v10, p.311, 2009.

TSUKASAKI, K. *et al.* Infective dermatitis among patients with ATL in Japan. **International Journal of Cancer**, v. 57, p. 293, 1994.

TSUKASAKI, K. *et al.* Infective dermatitis among patients with ATL in Japan. **International Journal of Cancer**, v. 57, p. 293, 1994.

USUI, T. *et al.*, Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. **Retrovirology**, v.5 p.1-11, 2008.

VALERIO, W. *et al.*, Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. **Blood**, v. 116. p. 3809-3917, 2010.

WYCUFF, D. R., *et al.* Identification of an initiator-like element within the HTLV-I promoter. **Virology**, v. 280(1), p. 72-79, 2001.

YASUNAGA, J.; MATSUOKA, M. Human T-Cell Leukemia Virus Type I Induces Adult T-Cell Leukemia: From Clinical Aspects to Molecular Mechanisms. **Cancer Control.**, v. 14 (2), p. 133-140, 2007.

YOSHIDA, M. *et al.* Monoclonal integration of human T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia suggest causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 2534-2537, 1984.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.79, p. 2031-2035, 1982.