

FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ - CPqGM

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E MEDICINA
INVESTIGATIVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CARGA PROVIRAL E DA EXPRESSÃO DOS
GENES VIRAIS *tax* E *HBZ* NA LEUCEMIA/LINFOMA DE CÉLULAS T
DO ADULTO (ATL)

ISABELA ARCHANJO NÚÑEZ

Salvador – Brasil

2013

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ - CPqGM

Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

**ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CARGA PROVIRAL E DA EXPRESSÃO DOS
GENES VIRAIS *tax* E *HBZ* NA LEUCEMIA/LINFOMA DE CÉLULAS T
DO ADULTO (ATL)**

ISABELA ARCHANJO NÚÑEZ

Orientadora: Dr^a Maria Lourdes Farré Vallve

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

Salvador – Brasil

2013

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca do CPqGM/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

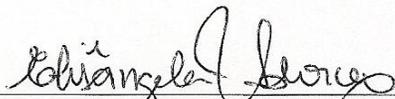
Núñez, Isabela Archanjo	
N972e	Análise dos níveis de carga proviral e da expressão dos genes virais <i>tax</i> e <i>HBZ</i> na Leucemia/Linfoma de células T do adulto (ATL). [manuscrito]/por Isabela Archanjo Núñez. – 2013.
	78 f.: il.; 29 cm
	Datilografado (fotocópia)
	Dissertação (mestrado)- Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2013.
	Orientador: Profª Drª Maria Lourdes Farré Vallve. Laboratório de Patologia Experimental.
	1. ATL. 2. HTLV-1. 3. Carga proviral. 4. <i>tax</i> . 5. <i>HBZ</i> . I. Título.
	CDU 616.98-006

“EXPRESSÃO DOS GENES VIRAIS *tax* E *HTLV-1 bZIP factor (HBZ)* NA LEUCEMIA /LINFOMA DE CÉLULAS T DO ADULTO (ATL)”

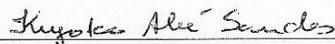
ISABELA ARCHANJO NUÑEZ

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr^a Eusângela Vitória Adorno
Professor adjunto
UFBA



Dr^a Kiyoko Abé Sandes
Professor Pleno
UNEB



Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara
Pesquisador Titular
FIOCRUZ/BA

*Aos meus pais, a meu irmão e a
Felipe, ofereço e dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e fé para encontrar o equilíbrio e a harmonia em todas as situações.

À minha família por todo o apoio, amor e confiança.

Ao meu namorado Felipe pela paciência, amor, incentivo e por sempre estar do meu lado me apoiando em todas as minhas decisões.

Aos meus amigos do Sacrá pelo carinho de sempre e momentos de alegria.

À minha orientadora Dr^a Lourdes Farré por ter acreditado em mim, pela confiança, dedicação, e paciência.

Ao meu grupo e aos que já passaram pelo grupo do CPqGM/FIOCRUZ: Juliana Argôlo, Marcelo Magalhães, Everton Batista, Leandro Cedraz, Tiago Ladim e Vanessa Leite.

À Dr^a Achiléa Candida Lisboa Bittencourt e o grupo do HUPES/UFBA (Pedro Oliveira, Lucas Sena, Mariana Bastos, Dr^a Fátima Paim e Dr^a Janeusa Primo) pela colaboração e apoio.

À Dr^o Zilton Andrade, chefe do Laboratório de Patologia Experimental, e a todos os colegas de laboratório.

Ao CNPq e ao CPqGM/FIOCRUZ pelo apoio financeiro.

“[...] talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito [...] não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

RESUMO

A Leucemia/Linfoma de células T do adulto (*Adult T-cell leukemia* - ATL) é uma neoplasia humana agressiva das células T CD4+ e que foi associada ao retrovírus HTLV-1. A diversidade das manifestações clínicas da ATL determinou a subdivisão desta neoplasia em cinco formas clínicas: aguda, linfoma, tumoral primária de pele, crônica e *smoldering*. O HTLV-1 é capaz de estimular a proliferação das células infectadas através dos produtos de alguns genes virais, sendo esta uma das estratégias para aumentar a carga proviral (*proviral load* – PVL). Dentre eles, o gene viral *tax* e o gene *HBZ* (*HTLV-1 basic leucine zipper factor*) são apontados como os principais responsáveis pela oncogenicidade do HTLV-1. Não está bem estabelecida a relação entre os níveis de carga proviral e os níveis de expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nas diferentes formas clínicas desta neoplasia. Foram descritos dois transcritos para o gene *HBZ*, o *HBZ* e o *HBZ-SI*. Este estudo teve como objetivo a análise da carga proviral e da expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nas diferentes manifestações da ATL. Foram incluídos no estudo 60 pacientes de ATL para a análise da carga proviral e destes, foi realizado a análise da expressão viral em 38 pacientes. Adicionalmente, foram incluídos 16 portadores assintomáticos adultos. A expressão dos genes *tax* e *HBZ* e a carga proviral foram quantificadas pela técnica de PCR em tempo real considerando para a carga proviral a região *tax* do provírus e utilizando a β -globina como gene de referência e para expressão viral foi utilizado a β -actina como gene de referência. A mediana da carga proviral na ATL foi maior do que nos portadores assintomáticos ($p < 0,001$). Foi observada também uma correlação positiva entre a carga proviral e a linfocitose. As formas *smoldering*, linfoma e tumoral primária de pele apresentaram carga proviral similar a observada nos portadores assintomáticos. Na expressão dos genes virais na ATL e em portadores assintomáticos a mediana do transcrito *HBZ-SI* foi maior em relação ao transcrito *HBZ* ($p < 0,0001$ e $p = 0,003$, respectivamente) e ao gene *tax* ($p < 0,0001$ e $p = 0,003$, respectivamente). Observou-se uma correlação positiva entre os níveis de expressão de todos os transcritos estudados. Os níveis de expressão do gene *tax* e do transcrito *HBZ* também correlacionaram positivamente com a carga proviral, enquanto que a expressão do transcrito *HBZ-SI* não correlacionou. Os portadores assintomáticos apresentaram níveis maiores de expressão destes transcritos por célula infetada que os pacientes com ATL com forma aguda. O gene *HBZ*, principalmente o transcrito *HBZ-SI* parece ter um papel mais importante que o gene *tax* na

infecção pelo HTLV-1, independentemente da condição clínica. Os portadores assintomáticos parecem ter maior dependência da expressão destes transcritos para estimulação da proliferação celular e manutenção da carga proviral que as formas crônicas e agudas da ATL, que apresentam marcada linfocitose. Os níveis de expressão do transcrito HBZ-SI por célula infectada variam entre as diferentes formas clínicas da ATL.

Palavras-chave: ATL; HTLV-1; Carga proviral; *tax*; *HBZ*.

ABSTRACT

Adult T-cell leukemia (ATL) is an aggressive neoplasm of human CD4+ T cells and was associated with the retrovirus HTLV-1. ATL has different clinical manifestations and has been classified into five clinical types: acute, lymphoma, primary cutaneous tumoral, chronic and *smoldering*. The HTLV-1 is capable of stimulating of proliferation of infected cells through the products of some viral genes, this being one of strategies to increase the proviral load (PVL). Among them, the *tax* viral gene and the gene *HBZ* (*HTLV-1 basic leucine zipper factor*) are pointed as the main responsible for the oncogenicity of HTLV-1. Is not fully understood the relation between the levels of proviral load and the levels of expression of the viral genes *tax* and *HBZ* in different clinical type of this neoplasm. We describe two transcripts for the *HBZ* gene, the *HBZ* and *HBZ-SI*. The goal of this study was to analyze the proviral load and the expression of viral genes *tax* and *HBZ* in the different manifestations of ATL. Was included 60 patients for the proviral load analysis and these was performed the analysis of viral expression in 38 patients. Additionally, we included 16 asymptomatic adults. The expression of *tax* and *HBZ* genes and proviral load were quantified by PCR real time considering to proviral load the region *tax* of the provirus and using the *β -globin* gene as a reference gene and for the viral expression was used *β -actin* as a reference gene. The proviral load median on ATL was higher than in asymptomatic patients ($p < 0.001$). It was also observed a positive correlation between the proviral load and lymphocytosis. The *smoldering*, lymphoma and primary cutaneous tumoral types showed similar proviral load to that observed in asymptomatic carriers. In the expression of viral genes in ATL and in asymptomatic carriers the median of transcript *HBZ-SI* was higher compared to the transcript *HBZ* ($p < 0.001$ and $p = 0.0003$, respectively) and the *tax* gene ($p < 0.001$ and $p = 0.0003$, respectively). There was a positive correlation between the expression levels of all the transcripts studied. The expression levels of the *tax* gene and the transcript *HBZ* also positively correlated with the proviral load whereas the expression of transcript *HBZ-SI* did not correlate. Asymptomatic carriers had higher levels of expression of these transcripts per cell infected that the ATL patients with acute type. The *HBZ* gene, mainly the transcript *HBZ-SI* seems to have a more important role than the *tax* gene in HTLV-1, regardless of the clinical condition. Asymptomatic carriers appear to have greater dependency of the expression of these transcripts for stimulation of cell proliferation and maintenance of the proviral load that the chronic and

acute types of ATL, which have marked lymphocytosis. The expression levels of transcript HBZ-SI by infected cell vary between different clinical types of ATL.

Key-words: ATL; HTLV-1; Proviral load; *tax*; *HBZ*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura do genoma do HTLV-1. Os genes estruturais *gag*, *pol* e *env* são flanqueados pelas 5' e 3' LTR (A). Estrutura dos mRNAs e localização das proteínas codificada pelo HTLV-1. Região pX, Tax, Rex e o antisense *HBZ* (*HTLV-1 basic leucine zipper factor*) (B) ————— 18
- Figura 2:** Distribuição geográfica global da infecção do HTLV-1 ————— 19
- Figura 3:** Taxas de prevalência (/1.000 doações) de infecção pelo HTLV-I/II em doadores de sangue nas capitais dos 26 estados e do Distrito Federal do Brasil ————— 20
- Figura 4:** “*Flower cells*” - células com núcleo multi-lobulado encontradas no sangue periférico de pacientes com ATL ————— 22
- Figura 5:** Curva de sobrevida de 70 pacientes apresentando diferentes formas clínicas da ATL ————— 23
- Figura 6:** Envolvimento cutâneo na ATL. A - Forma Tumoral Primária de Pele; B – *Smoldering*; C – Crônica; D – Aguda ————— 25
- Figura 7:** Conjuntos extracelulares virais. Seguindo brotamento da célula infectada, o vírus HTLV-1 permanece associado à célula com uma matriz contendo componentes da matriz extracelular (ECM). Em contato, estas montagens adesivas virais são rapidamente transferidas para uma célula não infectada, que venham a infectar 27
- Figura 8:** Contato célula-célula criando sinapses virológicas por onde o DNA genômico do HTLV-1 irá passar de uma célula infectada para uma célula não infectada. MTOC – centro de organização de microtúbulos ————— 27

Figura 9: Padrões de expansão clonal de linfócitos T infectados. (A) Expansão policlonal: a população linfocitária origina-se de vários linfócitos. (B) Expansão monoclonal: a população linfocitária origina-se de um único linfócito, por isso todos têm o DNA proviral integrado no mesmo local	28
Figura 10: Ações pleiotrópicas de Tax	30
Figura 11: Transcritos do gene HBZ: <i>HBZ non-spliced (HBZ)</i> e <i>spliced (HBZ-SI)</i>	31
Figura 12: Ilustração esquemática da expressão e das atividades do RNA e da proteína do gene HBZ em células infectadas pelo HTLV-1	32
Figura 13: Modelo esquemático do curso natural a partir da infecção pelo HTLV-1 para o aparecimento da ATL. O HTLV-1 é transmitido pelo contato célula-célula de células infectadas pelo HTLV-1. Após a infecção, o HTLV-1 promove a proliferação clonal de células infectadas por Tax e HBZ. No entanto, a proliferação das células infectadas pelo HTLV-1 é também controlada pelas células T citotóxicas <i>in vivo</i> . Durante o período de latência, as alterações genéticas e epigenética acumulam-se no genoma do hospedeiro. Na fase final, a expressão de Tax é inativada, sugerindo que Tax não é sempre necessário nesta fase. Por outro lado, HBZ é importante em todas as fases	33
Figura 14: Quantificação absoluta por PCR em tempo real dos níveis de carga proviral. Análise dos níveis de carga proviral dos pacientes com ATL e dos portadores assintomáticos utilizando o teste estatístico Mann-Whitney	48
Figura 15: Quantificação absoluta por PCR em tempo real dos níveis de carga proviral. Análise dos níveis de carga proviral dos pacientes com ATL nas diferentes formas clínicas e dos portadores assintomáticos utilizando o teste estatístico Mann-Whitney	48

- Figura 16:** Análise de correlação entre a carga proviral e o nível de linfócitos nos pacientes com ATL utilizando o teste estatístico Spearman's rank ————— 49
- Figura 17:** Quantificação absoluta por PCR em tempo real dos níveis de carga proviral. Análise dos níveis de carga proviral dos pacientes com ATL e dos pacientes com ATL associada com HAM/TSP utilizando o teste estatístico Mann-Whitney — 51
- Figura 18:** Quantificação absoluta realizada por PCR em tempo real utilizando 1µg de cDNA para cada gene. Análise dos níveis de expressão dos genes de referência HPRT e *β-actina* ————— 53
- Figura 19:** Quantificação absoluta por PCR em tempo real da expressão dos genes *HBZ* (transcritos HBZ e HBZ-SI) e *tax*. Análise dos níveis de expressão normalizada destes genes nos pacientes com ATL e portadores assintomáticos utilizando o teste estatístico Mann-Whitney ————— 54
- Figura 20:** Quantificação absoluta por PCR em tempo real da expressão dos genes *tax* e *HBZ* (transcritos HBZ e HBZ-SI). Análise dos níveis de expressão normalizada destes genes, ajustada pela carga proviral, nos pacientes com ATL e nos portadores assintomáticos utilizando o teste estatístico Mann-Whitney ————— 55
- Figura 21:** Análise de correlação entre os genes normalizados *tax* e *HBZ* utilizando o teste estatístico Spearman's rank. Na figura observa-se: (A) Correlação da expressão do gene *tax* e a expressão do transcrito HBZ; (B) Correlação da expressão do gene *tax* e a expressão do transcrito HBZ-SI; (C) Correlação da expressão dos transcritos HBZ e HBZ-SI ————— 56
- Figura 22:** Análise de correlação entre os genes normalizados *tax* e *HBZ* e a carga proviral utilizando o teste estatístico Spearman's rank. Correlação entre o nível de expressão do gene *tax* e a carga proviral (A) e do gene *HBZ* (transcritos HBZ (B) e HBZ-SI (C)) e a carga proviral nos pacientes com ATL ————— 57

Figura 23: Quantificação absoluta por PCR em tempo real dos genes *tax* e *HBZ* (transcritos *HBZ* e *HBZ-SI*). Análise dos níveis de expressão normalizada do gene *tax* (A) e do gene *HBZ* (transcritos *HBZ* (B) e *HBZ-SI* (C)), nos pacientes com ATL nas diferentes formas clínicas e nos portadores assintomáticos utilizando o teste estatístico Mann-Whitney _____ 59

Figura 24: Quantificação absoluta por PCR em tempo real dos genes *tax* e *HBZ* (transcritos *HBZ* e *HBZ-SI*). Análise dos níveis de expressão normalizada dos genes *tax* (A) e *HBZ* (transcritos *HBZ* (B) e *HBZ-SI* (C)), ajustada pela carga proviral nos pacientes com ATL nas diferentes formas clínicas e nos portadores assintomáticos utilizando o teste estatístico Mann-Whitney _____ 61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Características dos Pacientes de ATL estudados nas diferentes formas clínicas e dos portadores assintomáticos ————— 40
- Tabela 2:** Oligonucleotídeos utilizados para a reação de transcrição reversa ————— 43
- Tabela 3:** Oligonucleotídeos iniciadores para obtenção do fragmento dos genes *tax*, *HBZ* (*HBZ* e *HBZ-SI*), *HPRT* e *β -actina*, por PCR convencional, utilizados para a construção da curva padrão ————— 43
- Tabela 4:** Oligonucleotídeos utilizados para a quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real ————— 44
- Tabela 5:** 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 ————— 45
- Tabela 6:** Oligonucleotídeos e sondas utilizados para a quantificação da carga proviral por PCR em tempo real para os genes *tax* e *β -globina* ————— 46
- Tabela 7:** Sobrevida dos pacientes com ATL nas diferentes formas clínicas ————— 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1 (*Activator protein 1*)

ATL (*Adult T-cell leukemia/lymphoma*)

cDNA (*Complementary DNA*)

CREB (*cAMP response element-binding*)

CREB2 (*cAMP response element-binding 2*)

CTL (*Cytotoxic T Lymphocytes*)

Ct (*Cycle Threshold*)

DIH (*Dermatite infecciosa associada ao HTLV-1*)

E2F1 (*E2F transcription factor 1*)

ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

HAM/TSP (*Human T-lymphotropic virus type-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis*)

HBZ (*HTLV-1 basic leucine zipper factor*)

HBZ-SI (*Splicing isoform - SI*)

HIV (*Human immunodeficiency virus*)

HPRT (*Hypoxanthine ribosyl transferase*)

HTLV-1 (*Human T cell Lymphotropic Virus Type 1*)

HU (*HTLV-1 uveitis*)

HUPES (*Hospital Universitário Professor Edgard Santos*)

Jun D (*Transcription factor Jun-D*)

LTRs (*Long terminal repeats*)

NF- κ B (*Factor nuclear kappa B*)

PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

PCR (*Polymerase chain reaction*)

R² (*Coeficiente de correlação*)

SM (*Smoldering*)

SRF (*Serum response factor*)

TC (*Tumoral primária de pele*)

tRNA (*Transfer RNA*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. O vírus linfotrópico de células T humano do tipo 1 (<i>Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1</i> - HTLV-1)	18
1.1.1. Epidemiologia da infecção do HTLV-1	19
1.2. Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (<i>Adult T-cell leukemia/lymphoma</i> - ATL)	21
1.3. Patogenicidade do HTLV-1	26
1.3.1. Gene viral <i>tax</i>	28
1.3.2. Gene viral <i>HBZ</i>	30
1.4. Expressão dos genes <i>tax</i> e <i>HBZ</i> nos portadores assintomáticos adultos e na HAM/TSP	33
1.5. A carga proviral e o desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1	34
2. JUSTIFICATIVA	36
3. HIPÓTESE	37
4. OBJETIVOS	38
4.1. Objetivo Geral	38
4.2. Objetivos Específicos	38
5. MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1. Considerações éticas	39
5.2. População estudada para quantificação da carga proviral e da expressão dos genes <i>tax</i> e <i>HBZ</i>	39
5.3. Fluxograma das análises	41
5.4. Obtenção das amostras e extração de RNA e DNA	42
5.4.1. Obtenção do cDNA	42
5.5. Quantificação absoluta da expressão dos genes virais <i>tax</i> e <i>HBZ</i> e dos genes de referência HPRT e β -actina	43
5.6. Quantificação absoluta da carga proviral (PVL)	45
5.7. Análise estatística	46
6. RESULTADOS	47
6.1. CAPÍTULO 1 - Estudo da carga proviral na ATL	47
6.1.1. Carga proviral em pacientes com ATL e em portadores assintomáticos adultos	47

6.1.2. Carga proviral e o nível de linfocitose em pacientes com ATL	49
6.1.3. A carga proviral e a sobrevida nos pacientes com ATL	50
6.1.4. Carga proviral e a associação da ATL com HAM/TSP	51
6.1.5. Relação entre o envolvimento cutâneo, a idade no momento do diagnóstico e a carga proviral	52
6.2. CAPÍTULO 2 - Estudo da expressão dos genes virais <i>tax</i> e <i>HBZ</i> na ATL	53
6.2.1. Avaliação dos genes de referência HPRT e <i>β-actina</i>	53
6.2.2. Expressão dos genes <i>HBZ</i> (transcritos <i>HBZ</i> e <i>HBZ-SI</i>) e <i>tax</i> nos pacientes com ATL e nos portadores assintomáticos	54
6.2.3. Expressão dos genes <i>HBZ</i> (transcritos <i>HBZ</i> e <i>HBZ-SI</i>) e <i>tax</i> , ajustada pela carga proviral, nos pacientes com ATL nas diferentes formas clínicas e nos portadores assintomáticos	55
6.2.4. Correlação entre os níveis de expressão dos genes virais <i>HBZ</i> e <i>tax</i>	56
6.2.5. Correlações entre a expressão dos genes virais <i>HBZ</i> e <i>tax</i> e a carga proviral	57
6.2.6. Expressão dos genes virais <i>HBZ</i> (transcritos <i>HBZ</i> e <i>HBZZ-SI</i>) e <i>tax</i> nos pacientes com ATL nas diferentes formas clínicas e nos portadores assintomáticos	58
6.2.7. Expressão dos genes <i>HBZ</i> (transcritos <i>HBZ</i> e <i>HBZ-SI</i>) e <i>tax</i> , ajustada pela carga proviral, nos pacientes com ATL nas diferentes formas clínicas e nos portadores assintomáticos	60
7. DISCUSSÃO	62
7.1. CAPÍTULO 1 - Estudo da carga proviral na ATL	62
7.2. CAPÍTULO 2 - Estudo da expressão dos genes virais <i>tax</i> e <i>HBZ</i> na ATL	64
8. CONCLUSÕES	69
9. REFERÊNCIAS	70
10. ANEXO	78
10.1. ANEXO 1: Aprovação do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. O vírus linfotrófico de células T humano do tipo 1 (*Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1 - HTLV-1*)

O HTLV-1 foi originalmente identificado em 1980, nos Estados Unidos, após ser isolado de células derivadas de pacientes com linfoma cutâneo de células T (POIESZ et al., 1980) e posteriormente no Japão em soro de pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto (*Adult T-cell leukemia/lymphoma - ATL*) (ROBERT-GUROFF et al., 1982).

O HTLV-1 é um retrovírus envelopado que possui no interior do seu capsídeo duas cópias de RNA associadas a uma molécula de RNA transportador (tRNA) que serve como iniciador para a síntese de DNA. O seu DNA proviral possui cerca de 9kb (SEIKI et al., 1983). Sua organização é similar aos outros retrovírus, possuindo os genes *gag*, *pol* e *env*, além de uma sequência localizada entre o gene *env* e a extremidade 3', conhecida como região *pX*, que é responsável por codificar as proteínas regulatórias deste retrovírus, são elas: Tax, Rex e HBZ (*HTLV-1 basic leucine zipper factor*) e as proteínas acessórias: p12, 13, p30 (Figura 1B) que estão relacionadas com o processo de infecção viral e proliferação das células infectadas (MATSUOKA, 2003; FRANCHINI et al., 2003). O gene *HBZ* foi recentemente identificado no sentido *antisense* (3'→5') (GAUDRAY et al, 2002). As extremidades do genoma são flanqueadas por duas sequências repetidas, chamada LTRs (*long terminal repeats*) (Figura 1A).

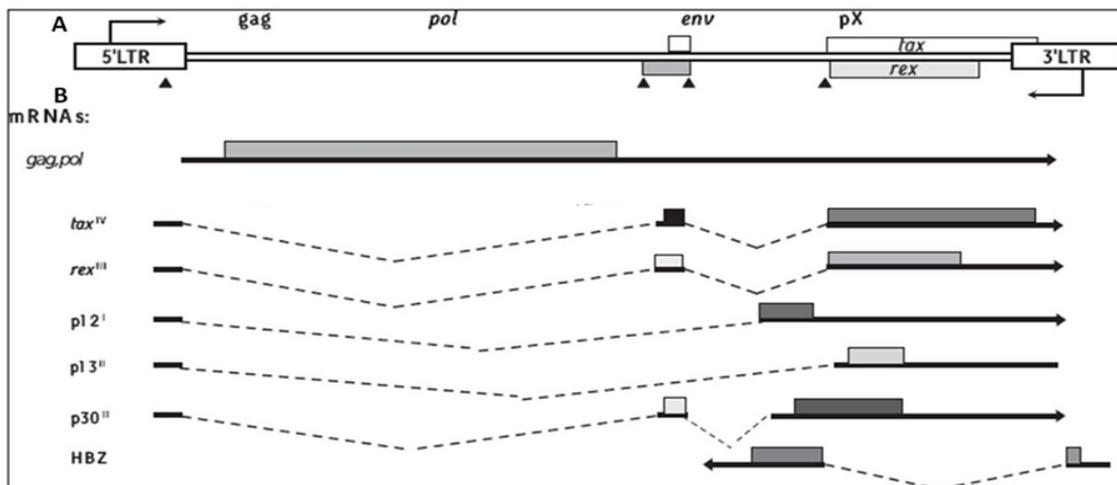


Figura 1: Estrutura do genoma do HTLV-1. Os genes estruturais *gag*, *pol* e *env* flanqueados pelas 5' e 3' LTR (A). Estrutura dos mRNAs e localização das proteínas codificada pelo HTLV-1. Região *pX*, Tax, Rex e o antisense *HBZ* (B). **Fonte:** IARC, 1996.

1.1.1. Epidemiologia da infecção do HTLV-1

Estima-se que 5 a 10 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com o HTLV-1 (GESSAIN & CASSAR, 2012). São consideradas áreas de alta endemicidade para o HTLV-1, o Japão, o Caribe, a América do Sul, a África, o Oriente Médio e a Australo-Melanésia (Figura 2) (MUELLER, 1991; YAMASHITA et al., 1995; GESSAIN & CASSAR, 2012). O Brasil pode ter o maior número absoluto de soropositivos no mundo, cerca de 2,5 milhões e as maiores prevalências de infecção em amostras de banco de sangue foram detectadas nos estados do Maranhão, da Bahia e do Pará (Figura 3) (CATALAN-SOARES et al., 2005). Na população geral de Salvador, a infecção pelo HTLV-1 estima-se que ocorre em uma prevalência de 1,76 %. As taxas de infecção reportadas foram de 1,2% para os homens e 2% para as mulheres (DOURADO et al., 2003). Uma possível explicação para a diferença de taxas entre os sexos é a maior eficácia da transmissão sexual homem-mulher do que o inverso (KAPLAN et al., 1996).

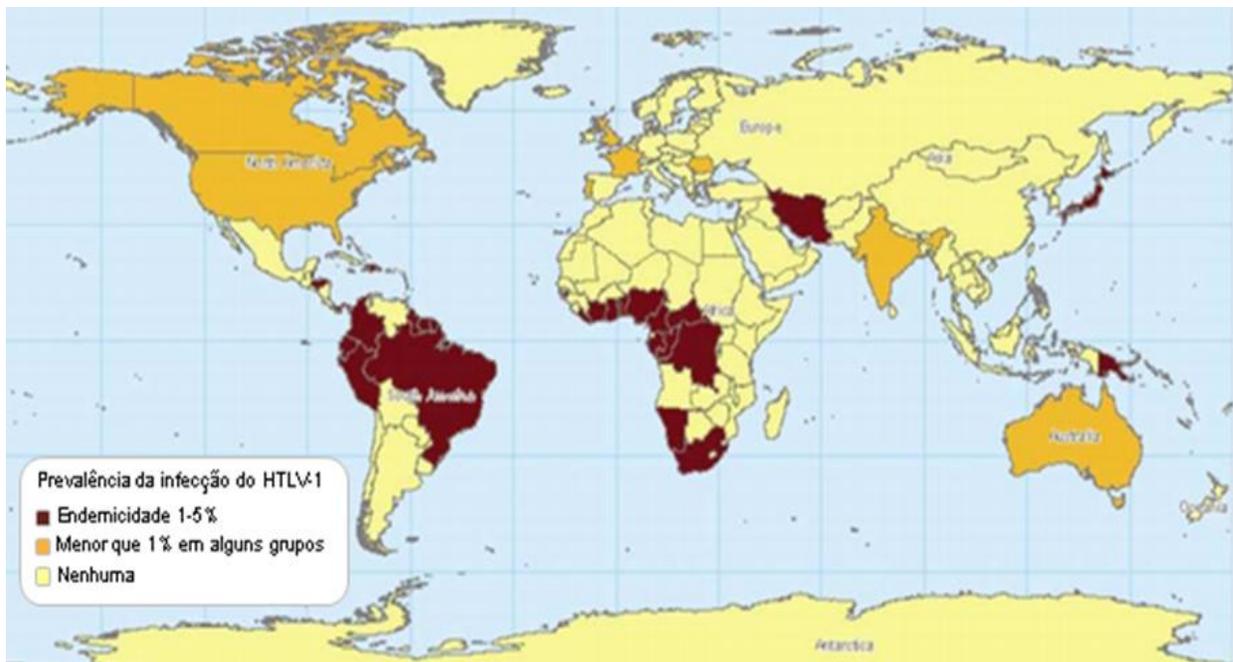


Figura 2: Distribuição geográfica global da infecção do HTLV-1. **Fonte:** PROETTI, et al., 2005.

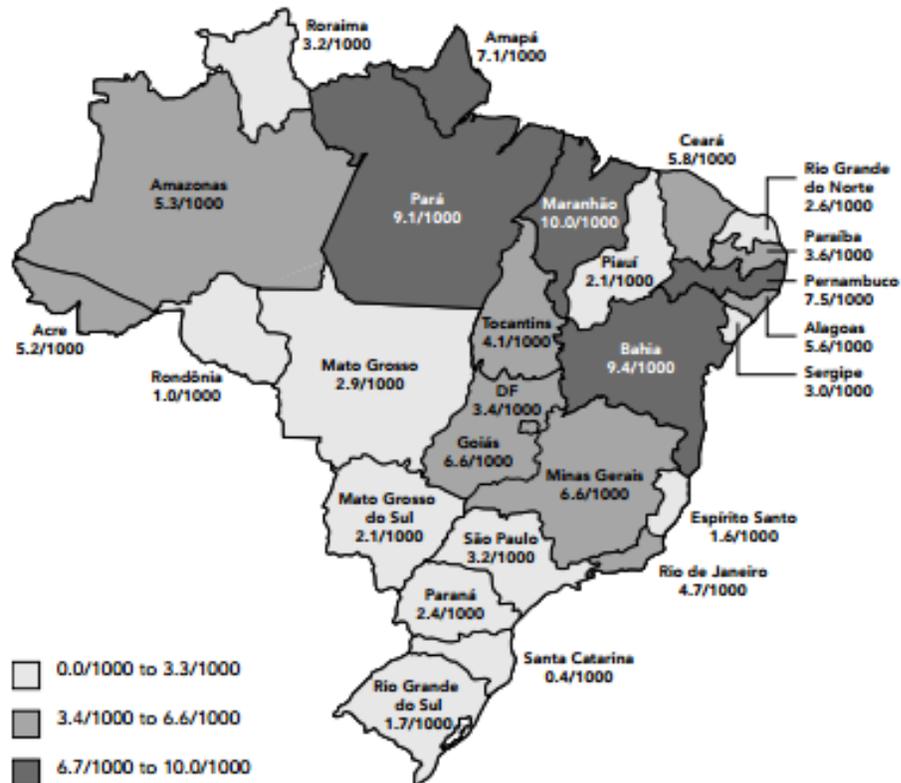


Figura 3: Taxas de prevalência (/1.000 doações) de infecção pelo HTLV-1/2 em doadores de sangue nas capitais dos 26 estados e do Distrito Federal do Brasil. **Fonte:** CATALAN-SOARES *et al.*, 2005.

A transmissão do HTLV-1 ocorre, principalmente, por três vias: a) horizontal (contato sexual) (STUVER *et al.*, 1993); b) vertical (da mãe para o filho), caracterizada principalmente pela amamentação, onde a probabilidade de transmissão materno-infantil é de 10%-30% e por transmissão transplacentária, durante o parto (TAJIMA & HINUMA, 1992); e c) parenteral, ocorrendo através da transfusão de sangue contaminado e seus derivados, bem como o uso de seringas ou perfuro-cortantes contaminados (SCHREIBER *et al.*, 1996).

1.2. Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (*Adult T-cell leukemia/lymphoma - ATL*)

A ATL é uma neoplasia humana e foi descrita como uma entidade clínica distinta em 1977 em Kyoto, Japão (TAKATSUKI et al., 1977; UCHIYAMA et al., 1977). A doença se manifesta na idade adulta, apresentando normalmente, lesão de pele frequente, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e elevado número de leucócitos no sangue com células linfóides atípicas (TAKATSUKI, 2005). Em 1982 foi relacionada ao retrovírus HTLV-1 (ROBERT-GUROFF et al., 1982). Além da ATL, outras doenças foram associadas a este retrovírus como a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (*Human T-lymphotropic virus type-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis - HAM/TSP*) (GESSAIN et al., 1985; OSAME et al., 1986), a dermatite infecciosa associada ao HTLV-1 (DIH) (LA GRENADE et al., 1990), a uveíte associada ao HTLV-1 (*HTLV-1 uveitis - HU*) (MOCHIZUKI et al., 1992) e a artropatia (NISHIOKA et al., 1989). Na Bahia, observam-se todas estas patologias causadas pelo HTLV-1 (BITTENCOURT et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2005; PRIMO et al., 2005; RATHSAM-PINHEIRO et al., 2009; POETKER et al., 2011).

A ATL é uma forma muito agressiva de neoplasia das células T (geralmente CD4+), não responde à quimioterapia e é, geralmente, fatal nas formas mais graves. Esta doença é caracterizada por apresentar infiltrações da pele, no fígado, no trato gastrointestinal e no pulmão, hipercalcemia e células leucêmicas com núcleos multilobulado conhecidas como “*flower cells*” (Figura 4) (MATSUOKA, 2005; BITTENCOURT et al., 2007). 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 (TC), crônica e *smoldering* (SM) (SHIMOYAMA et al., 1991; BITTENCOURT et al., 2007).

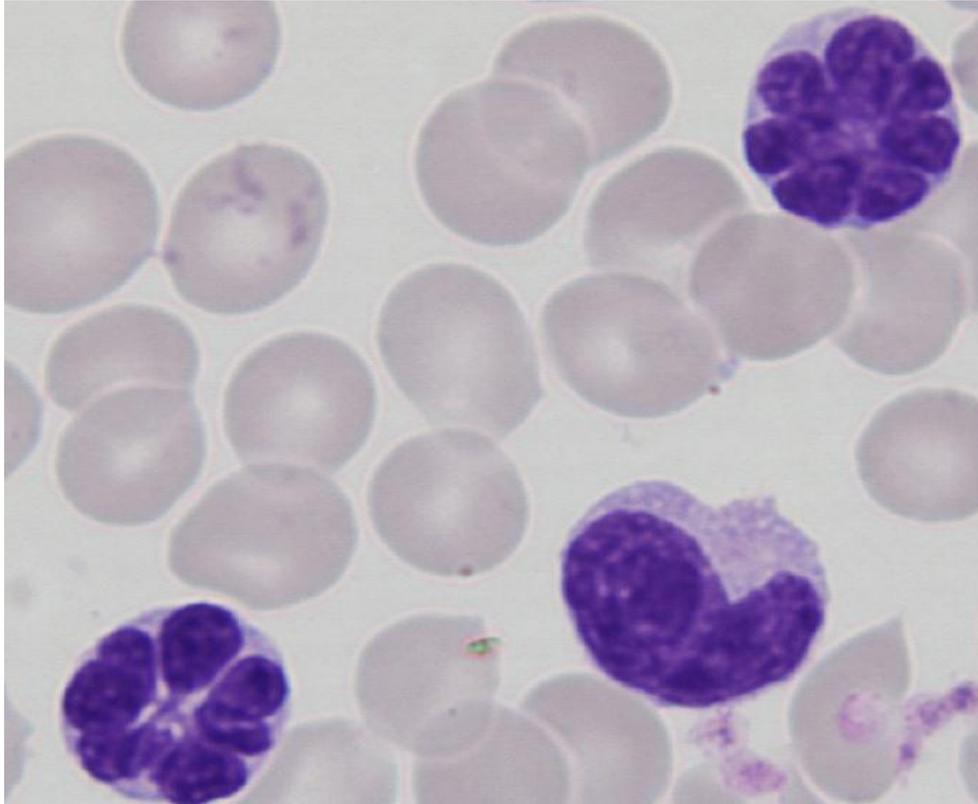


Figura 4: “*Flower cells*” - células com núcleo multi-lobulado encontradas no sangue periférico de pacientes com ATL. **Fonte:** MATSUOKA, 2005.

Indivíduos com a forma clínica aguda apresentam número elevado de células leucêmicas, linfadenopatia, hipercalcemia, hepatoesplenomegalia e lesões de pele. Apresenta 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), do osso ou do trato gastrointestinal e nem ascite, nem 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 osso ou do trato gastrointestinal e nem ascite nem 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 & 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 (Figura 5) (BITTENCOURT et al., 2007).

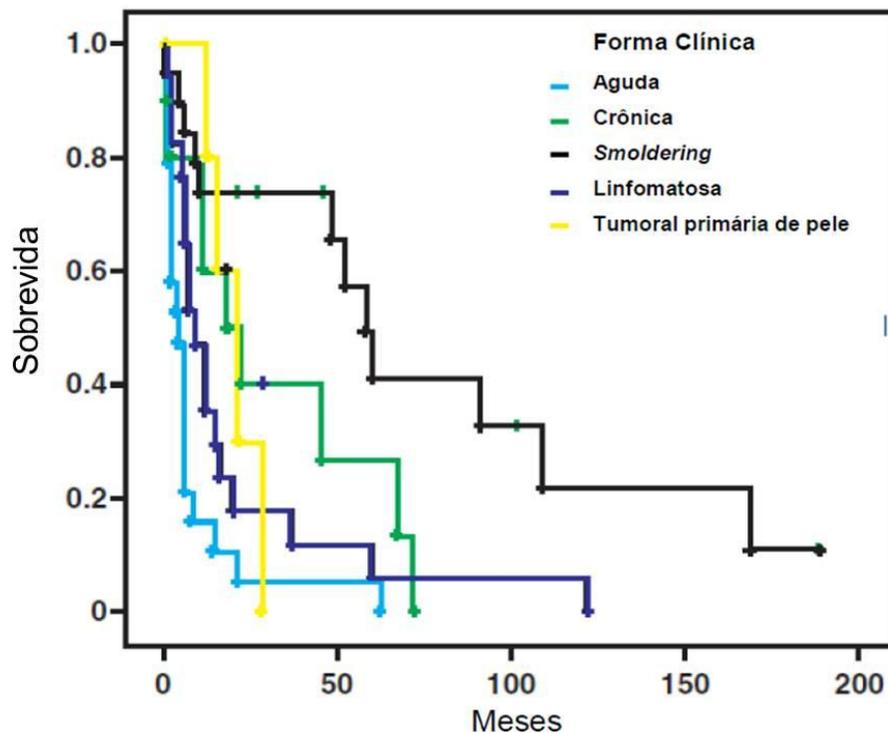


Figura 5: Curva de sobrevida de 70 pacientes apresentando diferentes formas clínicas da ATL. **Fonte:** Bittencourt et al. (2007).

Na Bahia, cerca de 67% dos casos de ATL apresentam envolvimento cutâneo (Figura 6), sendo mais frequente na forma *smoldering*, em que 80% dos casos desenvolvem lesões cutâneas (BITTENCOURT et al., 2007). Também foi reportado que cerca de 14% dos pacientes com ATL na Bahia desenvolveram previamente HAM/TSP (BITTENCOURT et al., 2007). Esta associação não foi descrita em outras áreas endêmicas.

A maioria dos portadores assintomáticos não desenvolve doenças associadas ao HTLV-1 (YASUNAGA & MATSUOKA, 2007), mas aproximadamente 2 – 5% dos portadores progridem para a ATL, após um longo período de latência. Este período, no Japão, é em torno de 60 anos, enquanto que no Brasil, a doença manifesta-se uma década mais cedo (ARISAWA et al., 2000; BITTENCOURT et al., 2007), desenvolvendo-se, geralmente, na idade adulta. Na literatura sugere-se que, durante este período a estimulação continuada da proliferação das células infectadas poderia estar levando a acumulação de alterações genéticas, e.g. mutação de p53, mais frequente dos éxons 4 ao 9, deleção de p16 nos éxons 2 e 3, (CESARMAN et al., 1992; SAKASHITA et al., 1992; UCHIDA et al., 1996) e epigenéticas, e.g. hipermetilação do DNA, modificação da histona, (NOSAKA ET AL., 2000; KOIWA *et al.*, 2002; TANIGUCHI et al., 2005) podendo ocorrer a transformação neoplásica da célula e como consequência o desenvolvimento da ATL (revisado em TAYLOR & MATSUOKA, 2005; YASUNAGA & MATSUOKA, 2007). Fatores que determinam o desenvolvimento desta patologia nesta percentagem de portadores são pouco conhecidos e não são conhecidos 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 e os pacientes adquirem o retrovírus principalmente por via vertical, através da amamentação (BARBOSA et al., 1999).

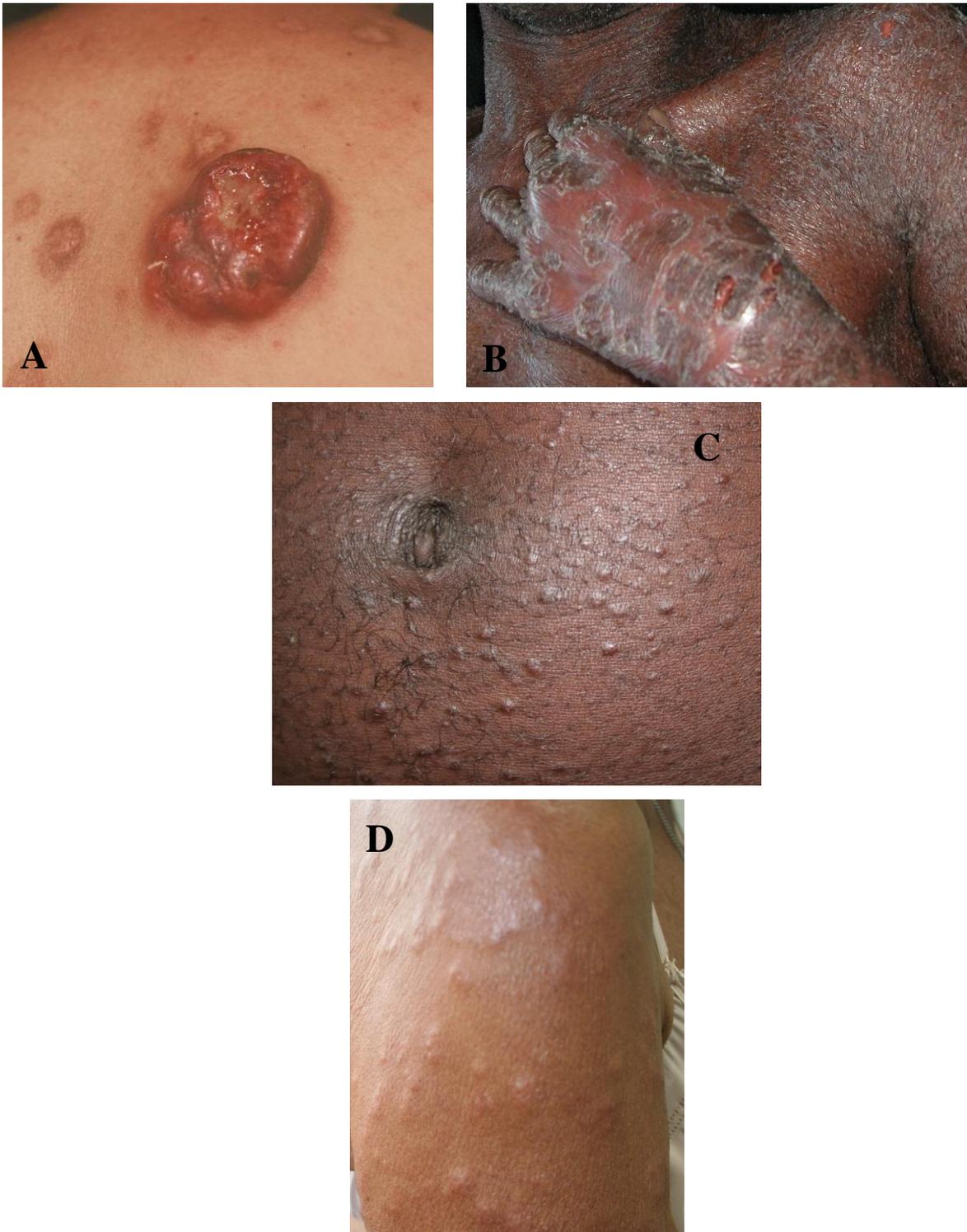


Figura 6: Envolvimento cutâneo na ATL. A - Forma Tumoral Primária de Pele; B - *Smoldering*; C - Crônica; D - Aguda. **Fonte:** Fotos cedidas por Dr^a Achiléia Bittencourt.

1.3. Patogenicidade do HTLV-1

O HTLV-1 tem capacidade de infectar diversos tipos celulares incluindo linfócitos B, linfócitos T, células dendríticas e monócitos (TAYLOR & MATSUOKA, 2005), porém, apresenta tropismo preferencial por linfócitos T CD4⁺ (YOSHIDA et al., 1984).

A propagação do retrovírus no indivíduo infectado pode ocorrer por partículas virais, biofilme, “sinapses virológicas” e por proliferação clonal. Foi observado em células infectadas pelo HTLV-1 aglomerados de partículas virais maduras na sua superfície (PAIS-CORREIA et al., 2009). Estes vírions estão presentes dentro de um determinado tipo de matriz sintetizada pelas células produtoras, que os autores chamam de biofilme (Figure 7). Esta rede viral/celular é enriquecida com componentes específicos da matriz extra-celular (ECM), incluindo HSPGs, agrina, colágeno e a proteína de ligação ao glicano de galectina-3. Quando as células de indivíduos infectados pelo HTLV-1 são expostas as células não infectadas, estes conjuntos são rapidamente transferidos para a célula-alvo (PAIS-CORREIA et al., 2009).

Apesar de existir como formas de transmissão do HTLV-1 as partículas virais e o biofilme, a principal forma de propagação deste retrovírus é através das “sinapses virológicas” (BANGHAM et al., 2003), onde acontece a transferência do material viral de uma célula infectada para outra célula não infectada por contato direto entre as mesmas (Figura 8). Embora o HTLV-1 infecte células alvo, principalmente através do contacto célula-célula, parece que a infecção por partículas virais livres não é eficiente e é pouco detectável (BANGHAM, 2003). E também pela proliferação clonal dos linfócitos infectados, onde produtos dos genes virais estimulam a divisão da célula hospedeira (Figura 9). Estas vias visam aumentar o número de células infectadas. Nos portadores de HTLV-1, como existe uma quantidade indetectável de partículas virais circulantes, o aumento do número de células infectadas é a principal forma de aumento da carga proviral (*proviral load* - PVL). Deste modo, a PVL pode ser avaliada pela quantificação do número de células infectadas, que contém uma cópia do DNA proviral inserido no DNA genômico humano.

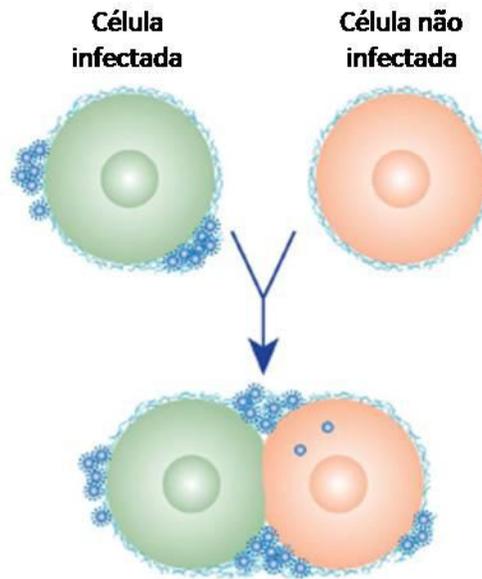


Figura 7: Conjuntos extracelulares virais. Seguindo brotamento da célula infectada, o vírus HTLV-1 permanece associado à célula com uma matriz contendo componentes da matriz extracelular (ECM). Em contato, estas montagens adesivas virais são rapidamente transferidas para uma célula não infectada, que venham a infectar. **Fonte:** PIQUE & JONES, 2012.

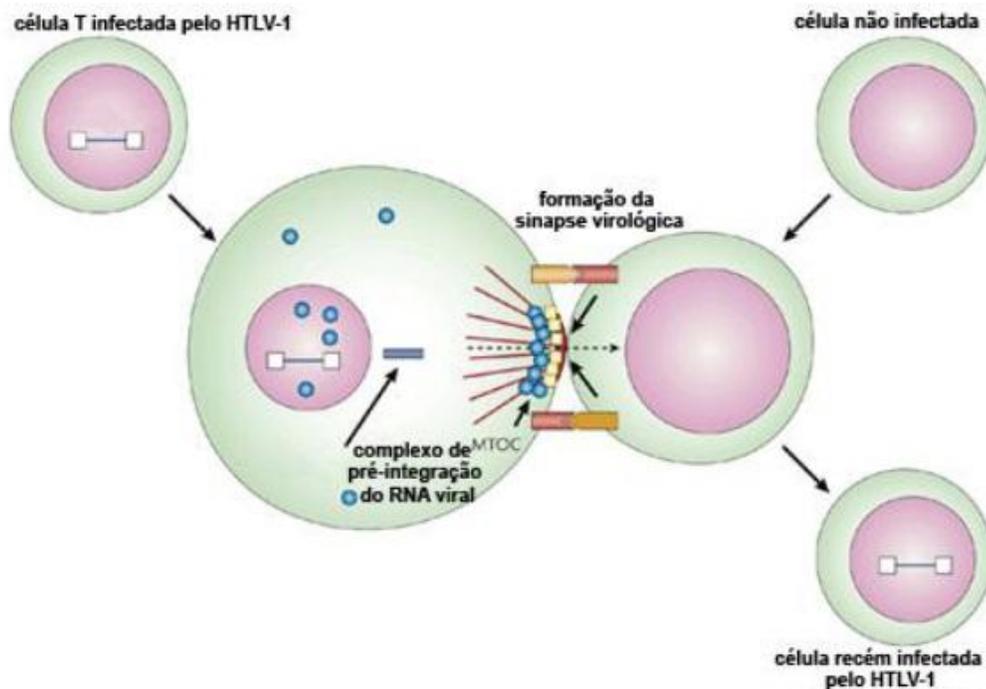


Figura 8: Contato célula-célula criando sinapses virológicas por onde o DNA genômico do HTLV-1 irá passar de uma célula infectada para uma célula não infectada. MTOC – centro de organização de microtúbulos. **Fonte:** Adaptado de MATSUOKA & JEANG, 2007.

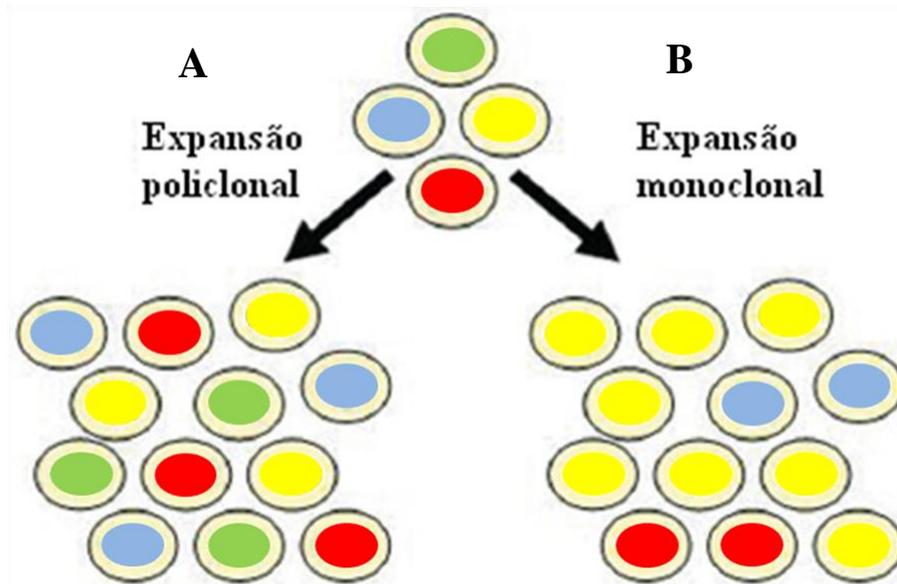


Figura 9: Padrões de expansão clonal de linfócitos T infectados. (A) Expansão policlonal: a população linfocitária origina-se de vários linfócitos. (B) Expansão monoclonal: a população linfocitária origina-se de um único linfócito, por isso todos têm o DNA proviral integrado no mesmo local. **Fonte:** BITTENCOURT & FARRE, 2008.

Acredita-se que o HTLV-1 estimula a proliferação clonal dos linfócitos infectados através dos produtos de alguns genes virais que se encontram na região *pX*. Estes genes se expressam após a integração do DNA proviral no genoma da célula hospedeira. Dentre eles, os principais relacionados com a proliferação da célula hospedeira são o gene *tax*, (MATSUOKA, 2003), cuja proteína foi apontada na literatura como tendo um papel essencial na patogenicidade do HTLV-1 e o gene *HBZ*, cuja função vem sendo recentemente estudada.

1.3.1. Gene viral *tax*

O gene *tax* codifica uma fosfoproteína de 40 kD (LEE *et al.*, 1984), localizada principalmente no núcleo, que é responsável pela ativação transcricional da região 5'LTR do HTLV-1 (MATSUOKA, 2003). Esta proteína é apontada como a principal responsável pela patogenicidade e oncogenicidade do HTLV-1, porque além de interagir com a região LTR do genoma proviral, a Tax interage com fatores de transcrição celulares através de vias de sinalização (e.g. NF- κ B, CREB, SRF e AP-1) para estimular ou reprimir a expressão de genes celulares (GRASSMANN *et al.*, 2005). Esta proteína viral induz o aumento da expressão de várias citocinas e receptores envolvidos no crescimento e proliferação das células T (KIM *et al.*,

1990; TSCHACHLER et al., 1993). Além dessa atividade transativadora, a Tax também é capaz de reprimir a expressão ou inativar um conjunto de genes celulares que atuam como inibidores do crescimento celular, podendo inibir o reparo do DNA e os eventos de morte celular programada (apoptose) (FRANCHINI, 1995; FRANCHINI & STREICHER, 1995; FERREIRA et al., 1997; MESNARD & DEVAUX, 1999; YOSHIDA, 2001).

A infecção pelo HTLV-1 confere um período de sobrevida maior à célula infectada devido às ações pleiotrópicas de Tax (Figura 10). Devido a estas ações de Tax, foi sugerido que esta proteína seria a responsável pela manutenção da proliferação e sobrevida das células infectadas tumorais na ATL. Porém, dados na literatura mostram que a expressão de Tax é baixa ou inexistente nas formas graves da ATL (TAKEDA, 2004). Um dos motivos apontados para a expressão reduzida desta proteína na ATL é que Tax é o principal alvo das células T citotóxicas (CTLs) no indivíduo infectado (KANNAGI et al., 2004). Assim, a expressão de Tax nas células infectadas pelo HTLV-1 proporciona vantagens e desvantagens para a sua sobrevivência. Desta forma, para escapar das CTLs, as células ATL frequentemente poderiam estar perdendo a expressão de Tax (revisado em YASUNAGA & MATSUOKA, 2007).

Alguns mecanismos de inibição da expressão de *tax* foram descritos na literatura, como: 1 – mutações pontuais, deleções ou inserções no gene *tax* (FURUKAWA et al., 2001; TAKEDA et al., 2004); 2 - metilação ou deleção da 5'LTR do DNA proviral (KOIWA et al., 2002; TAMIYA, et al., 1996); 3 - Mudança epigenética na região 5'-LTR, onde a hipermetilação do DNA e a modificação das histonas silencia a transcrição dos genes virais (KOIWA et al., 2002; TANIGUCHI, 2005). A ocorrência destes mecanismos pode ter como consequência à supressão da expressão de Tax favorecendo que as células infectadas possam escapar da ação do sistema imune do hospedeiro (YASUNAGA & MATSUOKA, 2007). Porém, a frequência em que estes fenômenos são detectados na ATL é baixa e não justificam a pequena ou inexistente expressão de *tax* nas células tumorais (MATSUOKA et al., 2007), sugerindo que outros mecanismos estariam envolvidos.

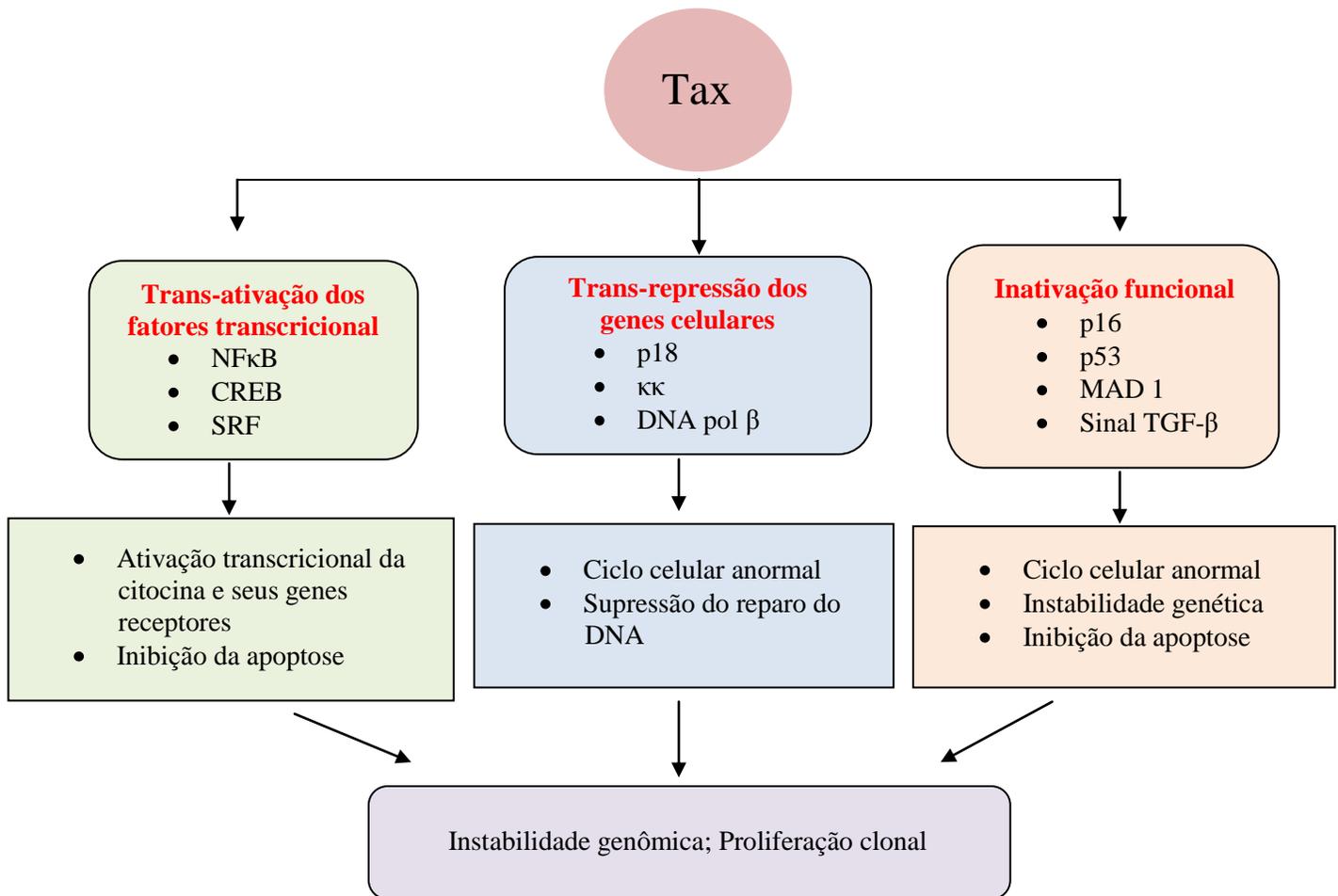


Figura 10: Ações pleiotrópicas de Tax. **Fonte:** MATSUOKA, 2003.

1.3.2. Gene viral *HBZ*

Recentemente foi descrito um novo gene viral, o *HBZ* (GAUDRAY et al., 2002) que é transcrito no sentido inverso ao gene *tax* (LAROCCA et al., 1989; SATOU et al., 2006). Foram descritas duas funções diferentes para o mRNA e para a proteína produzida por este gene. Enquanto o seu mRNA é capaz de estimular a proliferação celular dos linfócitos T, a proteína é capaz de inibir a transativação mediada por Tax. Este gene é codificado pela fita *antisense* do genoma proviral e o seu mRNA é sintetizado a partir de um promotor funcional localizado na região 3'LTR (MESNARD et al., 2006; GAUDRAY et al., 2002). A diferença da 5'LTR do provírus é que esta região pode estar suprimida ou hipermetilada na ATL, já a 3'LTR, parece não estar hipermetilada nem deletada. Isto poderia estar relacionado com o a manutenção da expressão do gene *HBZ* na ATL, sugerindo que este gene pode sustentar a sobrevivência da célula

infectada e levar à leucemogênese (ARNOLD et al., 2008).

Dois transcritos deste gene foram descritos com sítios de iniciação transcricional nas regiões U5 e R da 3'LTR (YOSHIDA et al., 2008), o transcrito HBZ e o transcrito HBZ-SI (*splicing isoform* - SI), que codifica uma proteína de 206 aminoácidos e é gerada por um *splicing* alternativo entre a parte do gene *HBZ* e um novo éxon localizado na 3'LTR do genoma do HTLV-1 (Figura 11) (MURATA et al., 2006; SATOU et al., 2006; USUI et al., 2008). O HBZ-SI parece ser uma das isoformas mais abundantes do gene *HBZ* (CAVANAGH et al., 2006). Desde que os mRNAs do HBZ e HBZ-SI foram relatados, alguns estudos que incluíram linhagens celulares derivadas de pacientes de ATL e pequenos grupos de pacientes com ATL com formas agressivas mostraram que o gene *HBZ* foi detectável em quase todas as células ATL, sugerindo que este gene esteja estreitamente envolvido na biologia celular da ATL (MESNARD et al., 2006).

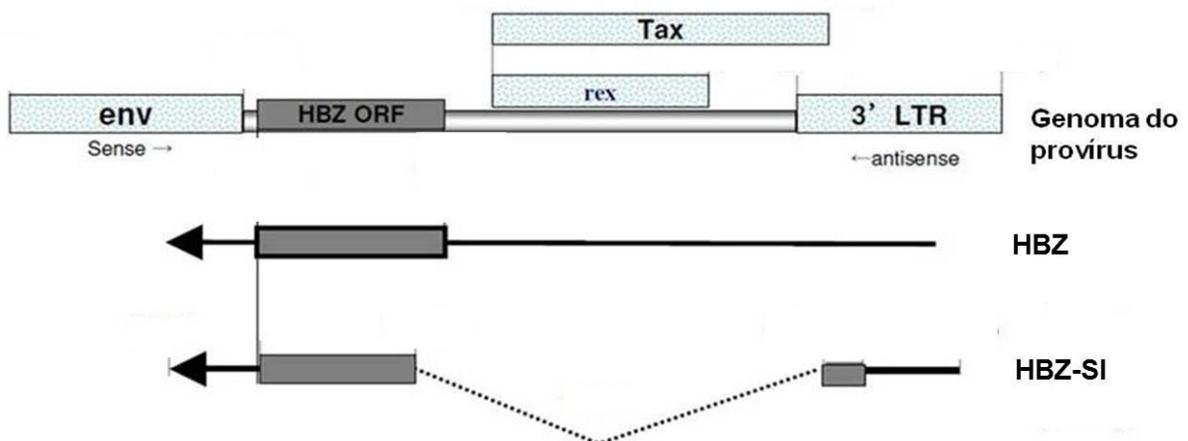


Figura 11: Transcritos do gene HBZ: *HBZ non-spliced* (HBZ) e *spliced* (HBZ-SI). Fonte: USUI et al., 2008.

Como comentado, a proteína HBZ inibe a transativação da transcrição viral mediada por Tax a partir da 5'LTR, por heterodimerizar com CREB2 (Figura 12) (SATOU et al., 2006). Ela também pode dimerizar com JunD e ativar a expressão de genes celulares com resposta à Jun (BASBOUS et al., 2003; THEBAULT et al., 2004). Por outro lado, foi visto que o mRNA do HBZ pode estimular a transcrição de E2F1 e de muitos genes celulares que respondem a esse fator de transcrição, sendo importante na proliferação celular (SATOU et al., 2006). Deste modo, o gene *HBZ* parece ter uma função bimodal em duas diferentes formas moleculares (LI & GREEN, 2007).

Desta forma, como na maioria das células de indivíduos com ATL, a expressão da proteína Tax parece ser baixa ou indetectável, sugere-se que a proliferação contínua destas células seja consequência da expressão do gene *tax* (SATOU et al., 2006) (Figura 13). 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. Por outro lado, os estudos incluem pequenas séries de pacientes. Os poucos dados que existem na literatura sobre a expressão do gene *HBZ* incluem unicamente pacientes com ATL com a forma aguda, a mais agressiva, e escassos casos com forma crônica (SATOU et al., 2006; MURATA et al., 2006), não incluindo a forma *smoldering* com curso clínico menos grave. A forma *smoldering* é mais frequente na Bahia (BITTENCOURT et al., 2007), porém raramente diagnosticadas no Japão, de onde provem os trabalhos disponíveis.

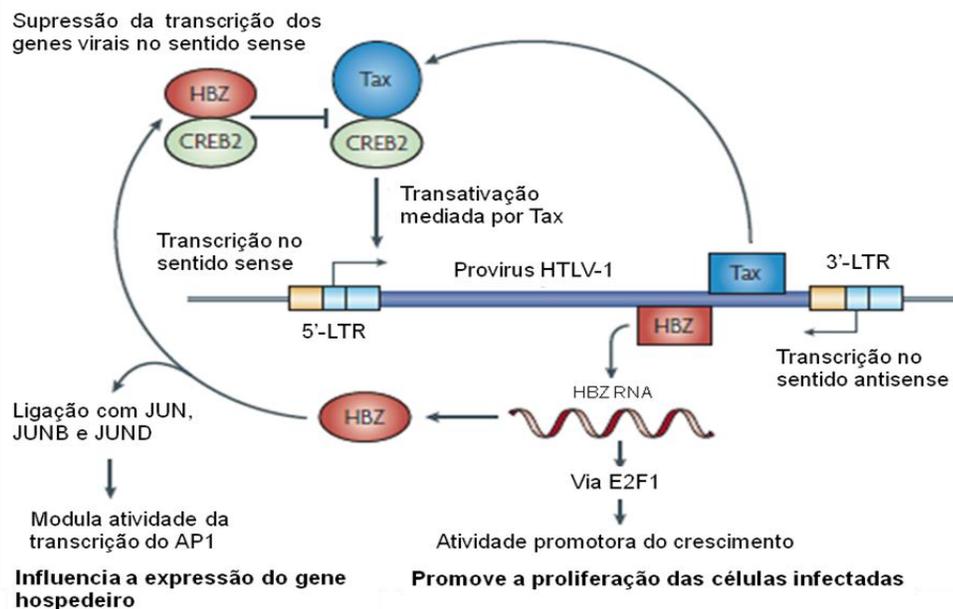


Figura 12: Ilustração esquemática da expressão e das atividades do RNA e da proteína do gene HBZ em células infectadas pelo HTLV-1. **Fonte:** MATSUOKA & JEANG, 2007.

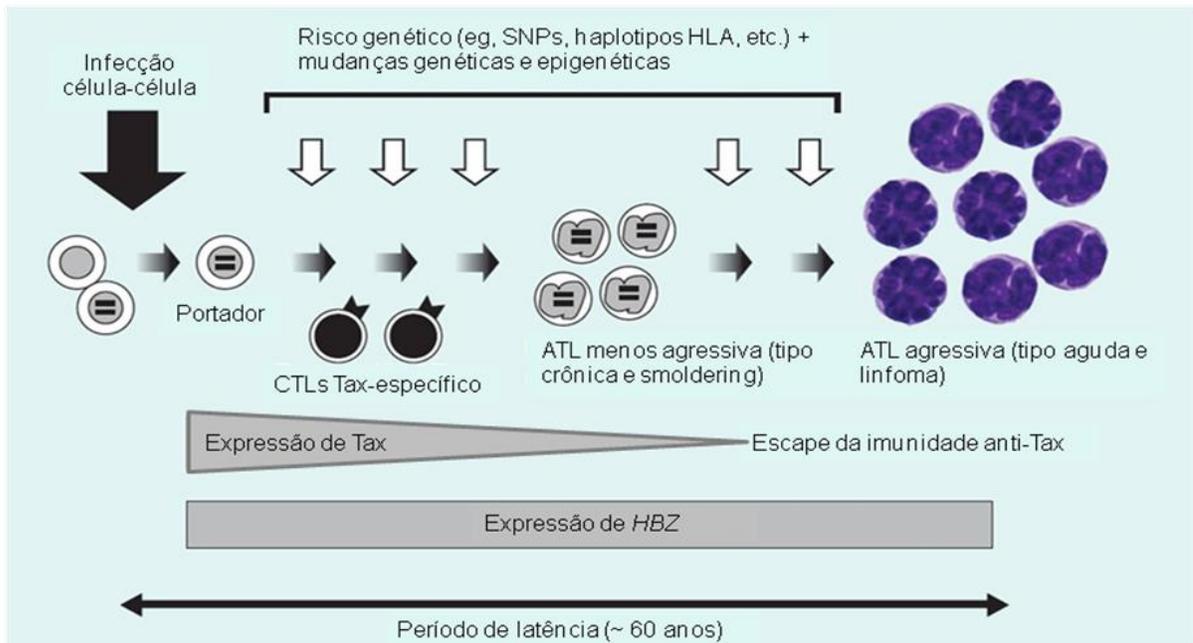


Figura 13: Modelo esquemático do curso natural a partir da infecção pelo HTLV-1 para o aparecimento da ATL. O HTLV-1 é transmitido pelo contato célula-célula de células infectadas pelo HTLV-1. Após a infecção, o HTLV-1 promove a proliferação clonal de células infectadas por Tax e HBZ. No entanto, a proliferação das células infectadas pelo HTLV-1 é também controlada pelas células T citotóxicas *in vivo*. Durante o período de latência, as alterações genéticas e epigenéticas acumulam-se no genoma do hospedeiro. Na fase final, a expressão de Tax é inativada, sugerindo que Tax não é sempre necessário nesta fase. Por outro lado, HBZ é importante em todas as fases. **Fonte:** YASUNAGA & MATSUOKA, 2007.

1.4. Expressão dos genes *tax* e *HBZ* nos portadores assintomáticos adultos e na HAM/TSP

A HAM/TSP é uma doença inflamatória crônica na qual ocorrem lesões no sistema nervoso central, uma enfermidade neurodegenerativa e com características progressivas levando a distúrbios motores e sensoriais (GESSAIN et al., 1985; OSAME et al., 1986; IZUMO, 2010). Aproximadamente, 4% das pessoas infectadas com o HTLV-1 desenvolvem esta doença (ORLAND et al., 2003). Níveis elevados de carga proviral foram associados com risco para o desenvolvimento da HAM/TSP. Porém, dados na literatura mostraram que os genes *tax* e *HBZ* são responsáveis pela patogênese da HAM/TSP (SAITO et al., 2009). A expressão dos genes *tax* e *HBZ* foi principalmente estudada em portadores assintomáticos adultos e pacientes com HAM/TSP. Nestes dois grupos de portadores do HTLV-1, a expressão do gene *tax* foi muito baixa ou inexistente enquanto a expressão do gene *HBZ* foi bastante elevada (SAITO et al., 2009). A forte correlação entre o nível de expressão entre estes dois genes, em indivíduos com HAM/TSP, e sua associação com diferentes aspectos da doença neurológica sugere que *tax* e

HBZ têm papéis importantes, mas distintos na patogênese da HAM/TSP. O gene *tax* parece ser crítico na iniciação da doença enquanto que o *HBZ* pode promover a progressão da doença, o que resulta em piora da função motora. Baseado nisto, para estimar o risco da HAM/TSP, é importante avaliar o nível de expressão do gene *tax*, em vez de apenas a carga proviral, bem como a expressão do gene *HBZ*, cujos níveis elevados podem ter valor prognóstico em relação à avaliação da progressão da doença, podendo também ser utilizado como um marcador substituto para prever o resultado a longo prazo em pacientes com HAM/TSP (ANDRADE et al., 2012; SAITO et al., 2009).

1.5. A carga proviral e o desenvolvimento das doenças associadas ao HTLV-1

A infecção viral nos indivíduos portadores do HTLV-1 é quantificada através do número de células infectadas, expressos como a carga proviral, o que tem sido demonstrado que possuem uma ampla variedade no sangue periférico entre os indivíduos infectados (NAGAI et al., 1998; YAKOVA et al., 2005). No entanto, a carga proviral média em pacientes com ATL, com HAM/TSP ou outras síndromes inflamatórias é significativamente mais elevado do que dos portadores assintomáticos (NAGAI et al., 1998; YAKOVA et al., 2005). Estes resultados indicam que a carga proviral pode ser marcador de risco importante para o desenvolvimento das doenças associadas.

A flutuação da carga proviral ao longo da infecção pelo HTLV-1 e na patogênese das doenças associadas ainda é pouco conhecida. Considera-se que a carga proviral em cada indivíduo seja relativamente estável na maior parte do tempo ao longo da infecção (MATSUZAKI et al., 2001). É provável que um equilíbrio dinâmico em cada portador seja alcançado pelo balanço entre o aumento das células infectadas pelo HTLV-1 e a taxa de sua eliminação pela resposta imune contra o retrovírus.

A carga proviral aumentada foi relatada em pacientes com HAM/TSP, HU (YOSHIDA et al, 1989; GESSAIN et al, 1990, ONO et al, 1995) e em pacientes com doenças reumáticas (YAKOVA et al., 2005), indicando o seu importante papel na patogênese destas doenças. A alta carga proviral está associada com o aumento do número de linfócitos infectados e o HTLV-1 parece desempenhar um papel, causando produção descontrolada de linfocinas ou a sobrevivência prolongada dos linfócitos T infectados (ETOH et al., 1997). O longo período de

latência dos portadores do HTLV-1 foi descrito como uma condição clínica com um número aumentado de células infectadas pelo HTLV-1, que era muitas vezes associado com o estado imunodeficiente e sendo considerado como pré-leucemia (YAMAGUCHI et al., 1989). Isto indicou como visto por Okayama e colaboradores em 2004, que a elevada carga proviral nos portadores assintomáticos também é considerada como alto risco de desenvolvimento para a ATL. Assim, a quantificação da carga proviral é de importância clínica para o diagnóstico e prognóstico da ATL e das outras doenças associadas ao HTLV-1.

Primo e colaboradores em 2009 observaram que o nível da carga proviral em pacientes com DIH é semelhante à dos pacientes com HAM/TSP e muito mais elevada do que a encontrada em portadores assintomáticos. Os altos níveis de carga proviral em pacientes com DIH não foram associados com duração da doença, idade do paciente e tempo de aleitamento materno, ou estado de atividade da doença de pele (PRIMO et al., 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Não foram bem estabelecidos os mecanismos de desenvolvimento da ATL e não se conhecem os fatores que determinam o desenvolvimento das diferentes formas clínicas desta neoplasia. O papel dos produtos dos genes virais e os seus mecanismos de regulação também não estão bem esclarecidos. A literatura mostra que os produtos dos genes da região *pX* parecem participar na indução da proliferação das células infectadas. Na ATL, estes estudos somente foram realizados considerando as formas mais agressivas da doença e em estudos oriundos do Japão que incluíram pequenos grupos de pacientes (SATO et al., 2006). Na Bahia, a forma *smoldering* da doença é mais reportada que no Japão (BITTENCOURT et al., 2009), o que pode permitir em um estudo realizado no nosso Estado, a inclusão de um maior número de casos desta forma e contribuir no entendimento do papel destes genes virais na manifestação das diferentes formas clínicas desta neoplasia. No nosso estudo incluímos também casos de forma tumoral primária de pele, umas das formas graves da ATL, que também não foi reportada no Japão.

Por outro lado, a PVL já foi associada ao desenvolvimento da HAM/TSP e da DIH (NAGAI et al., 1998; PRIMO et al., 2009). Porém, o valor da carga proviral como fator preditivo de desenvolvimento ou progressão da ATL não foi bem estabelecido (IWANAGA et al., 2010). Os estudos sobre carga proviral na ATL existentes incluem poucos casos das formas menos graves e quando presentes, estes não correspondem aos critérios de classificação de Shimoyama estabelecida em 1991 e adotada mundialmente.

Neste trabalho propomos o estudo sobre a carga proviral e os níveis de expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nas diferentes formas clínicas da ATL. Assim, pretendemos contribuir para o melhor entendimento da participação dos níveis da carga proviral e da expressão desses genes virais na ATL se relaciona com as manifestações e prognóstico.

No Estado da Bahia, a ATL corresponde a 33% das neoplasias de células T (BARBOSA et al., 1999). Esta neoplasia, assim como a infecção pelo HTLV-1 afeta principalmente a população afrodescendente e de baixa condição socioeconômica, que tem pouco acesso ao sistema de saúde, tornando-se um problema de saúde pública na região (DOURADO et al., 2003). Até o momento, não existe um esquema terapêutico efetivo para o tratamento desta neoplasia, fazendo-se necessário a identificação de novos alvos terapêuticos e biomarcadores importantes no desenvolvimento e progressão da doença.

3. HIPÓTESE

- A carga proviral nas diferentes formas clínicas da ATL é diferente e a alta carga proviral não se relaciona com a progressão da ATL;
- Os níveis de expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* são diferentes aos observados nos portadores assintomáticos e podem variar nas diferentes formas clínicas desta neoplasia e estar relacionado com o prognóstico.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Estudar os níveis de carga proviral e a expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* na leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL).

4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a carga proviral do HTLV-1 nos pacientes com ATL nas diferentes formas clínicas e em relação aos parâmetros clínicos;
- Analisar a expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nas células T infectadas contidas nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em pacientes com ATL;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Considerações éticas

Os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e o nosso estudo foi aprovado pelo Comitê de ética do HUPES/UFBA (Registro da CONEP nº 13097) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

5.2. População estudada para quantificação da carga proviral e da expressão dos genes *tax* e *HBZ*

Foram incluídos no estudo 60 pacientes, para a análise da carga proviral e destes, foi realizado a análise da expressão viral em apenas 38 pacientes. Todos os pacientes incluídos tiveram diagnóstico de ATL seguindo critérios clínico-patológico estabelecidos (SHIMOYAMA et al., 1991; BITTENCOURT et al., 2007) e que foram acompanhados no Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES/UFBA). Foram estudados os pacientes nas diferentes formas clínicas (Tabela 1). Dos 60 pacientes com ATL, 11 também tiveram HAM/TSP. Destes, três foram classificados como forma crônica e oito como *smoldering*. O desenvolvimento da HAM/TSP precedeu à manifestação da ATL. O diagnóstico da HAM/TSP foi realizado seguindo critérios pré-estabelecidos (OSAME et al., 1986). Também foram incluídos, por amostragem de conveniência, 16 portadores assintomáticos (AC) do HTLV-1 do sexo feminino. Estes também foram acompanhados no Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES/UFBA) e não mostraram aspectos relacionados com a manifestação de ATL, DIH ou HAM/TSP. Não foi possível realizar a quantificação da expressão viral nos 60 pacientes, pois só conseguimos obter RNA de 38 pacientes.

Nos portadores do HTLV-1 incluídos foi realizada a sorologia para o HTLV-1 pela técnica de ELISA e o resultado positivo foi confirmado por *Western Blot* ou PCR. Também foi realizada a sorologia para o HIV, sendo negativa em todos os casos.

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) destes indivíduos portadores do HTLV-1 encontravam-se criopreservadas no Laboratório de Patologia Experimental do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ. Em relação aos pacientes com ATL, as PBMCs foram

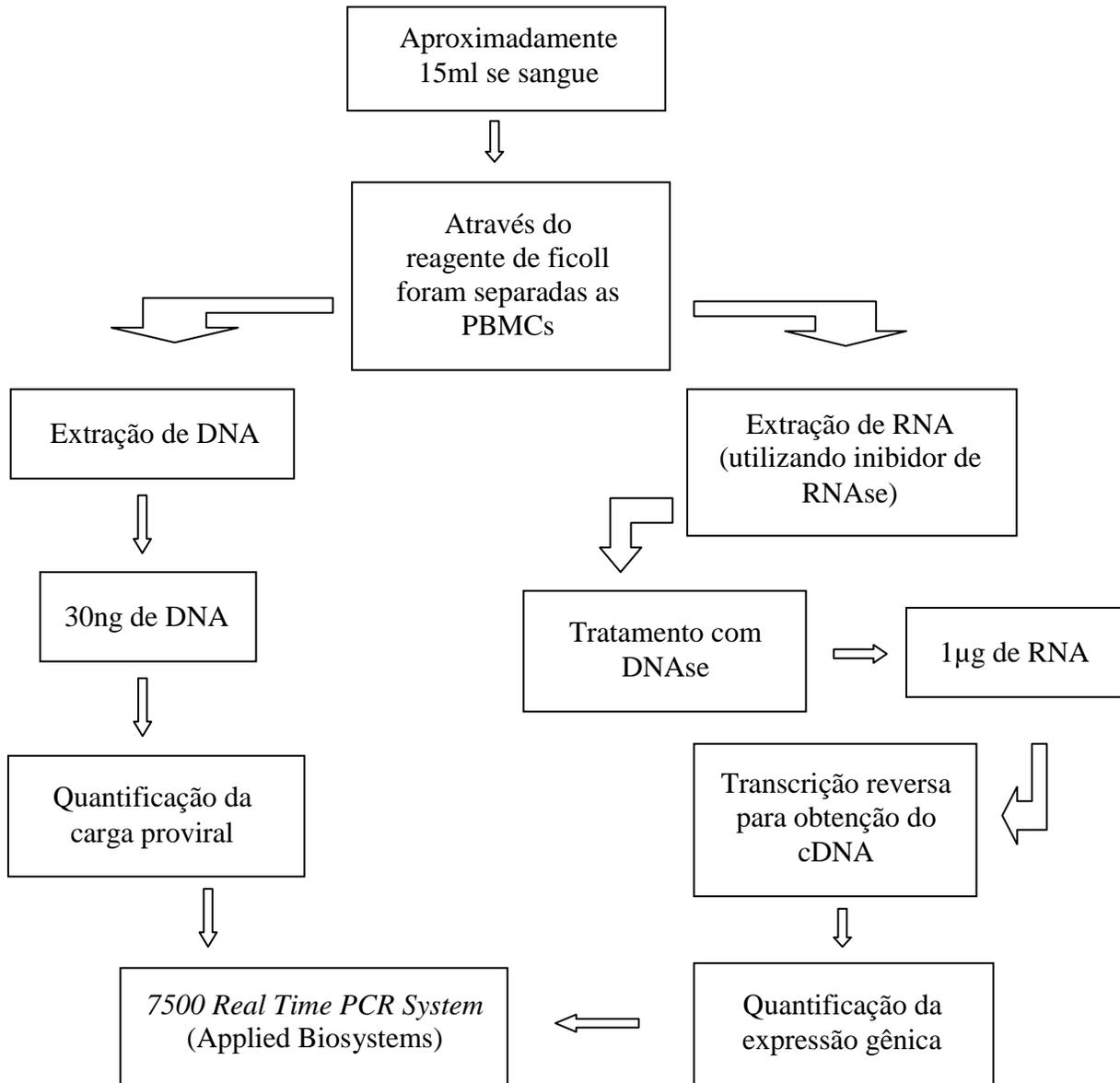
obtidas em coletas realizadas no momento do diagnóstico e antes do início do tratamento.

Tabela 1: Características dos pacientes com ATL estudados nas diferentes formas clínicas e dos portadores assintomáticos.

ESTUDO CARGA PROVIRAL	n (%)
Total de pacientes	60 (100)
Sexo	
Masculino	29 (48,3)
Feminino	31 (51,7)
Formas clínicas	
Aguda	17 (28,3)
Linfoma	9 (15)
Crônica	17 (28,3)
<i>Smoldering</i> (SM)	12 (20)
Tumoral primária de pele (TC)	5 (8,3)
Portadores assintomáticos	16
Sexo	
Feminino	16 (100)

ESTUDO EXPRESSÃO GENES <i>tax</i> e <i>HBZ</i>	n (%)
Total de pacientes	38 (100)
Sexo	
Masculino	15 (39,5)
Feminino	23 (60,5)
Formas clínicas	
Aguda	14 (36,8)
Linfoma	2 (5,3)
Crônica	10 (26,3)
<i>Smoldering</i> (SM)	9 (23,7)
Tumoral primária de pele (TC)	3 (7,9)
Portadores assintomáticos	16
Sexo	
Feminino	16 (100)

5.3. Fluxograma das análises



5.4. Obtenção das amostras e extração de RNA e DNA

As PBMCs foram previamente separadas por gradiente de ficoll de aproximadamente 15 mL de sangue periférico. 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)*. A extração de RNA foi realizada utilizando o kit *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN), seguindo instruções do fabricante, e após a extração foi adicionado inibidores de RNase para evitar a degradação do RNA (*RNasin Plus RNase inhibitor* - Promega®). Posteriormente estas amostras foram tratadas com DNase.

5.4.1. Obtenção do cDNA

Foi realizada uma única reação de transcrição reversa onde se utilizou oligos específicos para os genes *tax*, *HBZ* (*HBZ* e *HBZ-SI*) e para os genes de referência humanos *HPRT* e *β -actina*. Para a obtenção dos cDNAs foram utilizados os oligos no sentido *antisense* descritos na tabela 2. Antes de iniciar a reação de transcrição reversa todas as amostras foram tratadas com DNase com o kit *RQ1 RNase-Free DNase* (Promega®), seguindo instruções do fabricante: 2 μ l de DNase 10x Reaction Buffer, 1 μ l de RNase free DNase, incubando por 30' a 37°C, depois foi adicionado 1 μ l de *Stop Solution*, incubando novamente por 10' a 65°C. Ao final deste tratamento todas as amostras foram requantificadas para melhor controle da quantidade de RNA incluída na reação de transcrição reversa. Para esta reação de RT-PCR foi utilizado o kit *Superscript III* (Invitrogen™) seguindo instruções do fabricante. A quantidade de RNA utilizada para a transcrição reversa de cada amostra foi de 1 μ g que foi misturada a 1 μ l dos oligos específicos (2 μ M) para amplificação dos transcritos e 1 μ l do *anelling buffer* contendo inibidor de RNases, posteriormente incubado por 5' a 65°C. Após esta incubação foi adicionado o *2x First-Strand Reation mix* e o *Superscript III/RNase* e incubado por 50' a 50°C e 5' a 85°C.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para a reação de transcrição reversa.

Seqüência	Genes estudados
5'- AAATGTTTTTCACTGAGAGGCTCTAA -3'	<i>tax</i>
5'-TCTTCCTCCAAGGATAATAGCCCGTCCA-3'	HBZ e HBZ-SI
5'- CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT -3'	HPRT
5'-TCTCCATGTCGTCCCAGTTG-3'	<i>β-actina</i>

5.5. Quantificação absoluta da expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* e dos genes de referência *HPRT* e *β-actina*

A quantificação da expressão dos genes *tax*, *HBZ*, *HPRT* e *β-actina* foi realizada por PCR em tempo real em um termociclador *7500 Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando o kit *Fast SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Para o gene *HBZ* foi considerado os dois transcritos *HBZ* e *HBZ-SI* (MURATA et al., 2006), portanto, realizadas duas quantificações.

Para a quantificação da expressão destes genes foi necessário construir uma curva padrão para cada reação. Estas curvas foram obtidas através de produtos de PCR de cada gene estudado. Os oligos utilizados para a amplificação estão descritos na tabela 3. Após isto, foi calculado o número de moléculas existente e realizou-se uma diluição seriada de 10^9 - 10^0 dos produtos de PCR obtidos para os genes *tax*, *HBZ* (*HBZ* e *HBZ-SI*), *HPRT* e *β-actina*.

Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores para obtenção do fragmento dos genes *tax*, *HBZ* (*HBZ* e *HBZ-SI*), *HPRT* e *β-actina*, por PCR convencional, utilizados para a construção da curva padrão.

Seqüência	Genes estudados
5'- GATGGCACGCCTATGATTTTC -3'	<i>tax</i> (sense)
5'- GCAGCCCTGGCGTCGTGATT -3'	HPRT (sense)
5'- CCCCTTGAGCACACAGAGGGC -3'	HPRT (antisense)
5'- CAGCCCCTTGTCTCCACTTG -3'	HBZ e HBZ-SI (sense)
5'- ACCTTGAGGGTCTTAGAGGTTC -3'	HBZ (antisense)
5'- TAAACTTACCTAGACGGCGG -3'	<i>tax</i> e HBZ-SI (antisense)
5'-AGGCACCAGGGCGTGAT-3'	<i>β-actina</i> (sense)
5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA-3'	<i>β-actina</i> (antisense)

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)* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Como as curvas foram construídas utilizando o *Sybr Green* (Applied Biosystems), um corante que se liga por pontes de hidrogênio e com isso pode associar-se a nucleotídeos que não são os estudados, portanto, 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.

As condições de reação do PCR em tempo real para todos os genes avaliados foram: 95°C por 20s (para ativação da Taq polimerase) e 40 ciclos a 95°C por 3s (denaturação) e 60°C por 30s (anelamento e extensão). A dissociação foi feita a 95°C por 15s, 60°C por 1min, 95°C por 15s e 60°C por 15s. Os oligos utilizados na reação estão descritos na tabela 4. Para cada reação foi preparado um mix utilizando 10µL do *Fast SYBR® Green Master Mix (2x)*, 1µL do oligo sense, 1µL do oligo antisense, 1µL de cDNA e 7µL de água RNase free, totalizando 20µL de mix para uma amostra. As avaliações foram feitas em duplicata e a curva padrão foi repetida para cada placa.

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para a quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real.

Seqüência	Genes estudados
5'- CGAAAAAGAGGCAGATGACAATG -3'	<i>tax</i> (sense)
5'- AAATGTTTTTCACTGAGAGGCTCTAA -3'	<i>tax</i> (antisense)
5'- CAGTAGGGCGTGACGATGTA -3'	<i>HBZ</i> (antisense)
5'- TAAACTTACCTAGACGGCGG -3'	<i>HBZ-SI</i> (antisense)
5'- CAAGGATAATAGCCCGTCCA -3'	<i>HBZ</i> e <i>HBZ-SI</i> (sense)
5'- TGACCTTGATTTATTTTGCATACC -3'	<i>HPRT</i> (sense)
5'- CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT -3'	<i>HPRT</i> (antisense)
5'-AGGCATCCTCACCTGAAGTAC-3	<i>β-actina</i> (sense)
5'-TCTCCATGTCGTCCCAGTTG-3'	<i>β-actina</i> (antisense)

Os dados foram analisados mediante o software *7500 software v2.0.6* (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, os valores individuais de Ct das amostras padrão e o *Slope*, que indica a eficiência da amplificação para o ensaio. A quantificação da expressão dos genes constitutivos humanos HPRT e β -actina foi considerada para normalizar os resultados por possíveis variabilidades na quantidade ou qualidade do RNA ou cDNA.

5.6. Quantificação absoluta da carga proviral (PVL)

Para realizar a quantificação da PVL, partiu-se de 30ng de DNA para cada amostra. Inicialmente as amostras foram quantificadas, diluídas e requantificadas para maior controle da quantidade de DNA utilizado na reação. A carga proviral foi avaliada por PCR quantitativa em tempo real e o sistema usado foi o TaqMan e como gene de referência foi utilizado a β -globina. A quantificação da carga proviral serviu como referência para quantificar a expressão dos genes *tax* e *HBZ* (HBZ e HBZ-SI) podendo referenciar os resultados à ausência de células infectadas ou a baixa expressão dos genes estudados.

Para a construção das curvas de referência para o gene *tax* e para o gene β -globina foi utilizado produtos de PCR do gene *tax* e β -globina obtidos por PCR utilizando os oligonucleotídeos como descritos na tabela 5. Os produtos foram sequenciados e quantificados. Após isto foi calculado o número de moléculas existente e realizou-se uma diluição seriada de 10^6 - 10^1 .

Tabela 5: 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	Genes estudados
5'- CAGCCCCTTGTCTCCACTTG -3'	<i>tax</i> (sense)
5'- ACCTTGAGGGTCTTAGAGGTTC -3'	<i>tax</i> (antisense)
5'- GGCATAAAAGTCAGGGCAGAGCC -3'	β -globina (sense)
5'- GTCTTCTCTGTCTCCACATGCCCA -3'	β -globina (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 6. As reações foram realizadas no aparelho *7500 Fast Real Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando o kit *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As condições de amplificação para os dois genes foram: 50° por 2min, 95° por 10min, 95° por 15s e 60° por 1min, num total de 40 ciclos. Para cada reação foi preparado um mix utilizando 12,5μL do *TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x)*, 1μL do oligo sense (5μM), 1μL do oligo antisense (5μM), 1μL da sonda (2,5μM), 3μL de DNA (10ng) e 6,5μL de água, totalizando 25μL de mix para uma amostra. O mix utilizado para a curva padrão foi o mesmo, alterando apenas a quantidade de amostra utilizada que foi de 1μL e a de água que passou a ser de 8,5μL. A PVL foi expressa como número de cópias do HTLV-1/PVL. Os resultados foram analisados mediante o software *7500 v2.0.6* (Applied Biosystems). As avaliações foram feitas em duplicata e a curva padrão foi repetida para cada placa.

Tabela 6: Oligonucleotídeos e sondas utilizados para a quantificação da carga proviral por PCR em tempo real para os genes *tax* e *β-globina*.

Seqüência	Genes estudados
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'- CCTTGATACCAACCTGCCCAG -3'	<i>β-globina</i> (antisense)
5'- FAM/AAGGTGAAC/ZEN/GTGGATGAAGTTGGTGG/3IABkFQ -3'	<i>β-globina</i> (sonda)

5.7. Análise estatística

Os dados dos pacientes foram registrados em um banco de dados no excel e analisados com o programa GraphPad Prism v. 5.02 para a avaliação estatística. Foram calculadas as medianas dos valores de carga proviral e dos valores de expressão dos genes *tax* e *HBZ*. 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. Para análise das curvas de sobrevida foi utilizado o teste Log-rank. Uma probabilidade de $p \leq 0,05$ foi considerada significativa.

6. RESULTADOS

6.1. CAPÍTULO 1: Estudo da carga proviral na ATL.

6.1.1. Carga proviral em pacientes com ATL e em portadores assintomáticos adultos

A mediana da carga proviral dos 60 pacientes com ATL foi de 22,6 cópias em 100 PBMCs. Os portadores assintomáticos adultos apresentaram menor carga proviral com uma mediana de 5,7 cópias/100 PBMCs ($p=0,0007$, teste de Mann-Whitney) (Figura 14). Quando os pacientes com ATL foram separados por formas clínicas (Figura 15), os pacientes agudos apresentaram a maior carga proviral com mediana de 38,4 cópias/100 PBMCs seguido dos pacientes crônicos com uma mediana de 24,3 cópias/100 PBMCs ($p=0,0436$, teste de Mann-Whitney). A forma *smoldering* mostrou uma carga proviral média de 9,9 cópias/100 PBMCs, significativamente menor quando comparado aos grupos agudo ($p<0,0001$) e crônico ($p=0,0169$). As formas tumoral primária de pele e linfoma apresentaram menor carga proviral com mediana de 3,1 e 4,4 cópias/100 PBMCs, respectivamente. Estes valores são similares entre eles, porém estatisticamente diferentes da *smoldering* ($p=0,0239$ e $p=0,0124$, respectivamente), aguda ($p = 0,0025$ e $p = 0,0050$, respectivamente) e crônica ($p=0,0073$ e $p=0,0042$, respectivamente). Quando a carga proviral nas diferentes formas clínicas da ATL foi comparada com a carga proviral dos portadores assintomáticos, diferenças estatisticamente significativas foram observadas apenas em relação aos tipos agudo ($p<0,0001$) e crônico ($p=0,0002$). A carga proviral dos pacientes com formas clínicas *smoldering*, linfomatosa, e tumoral primária de pele foram similares as observadas nos portadores assintomáticos.

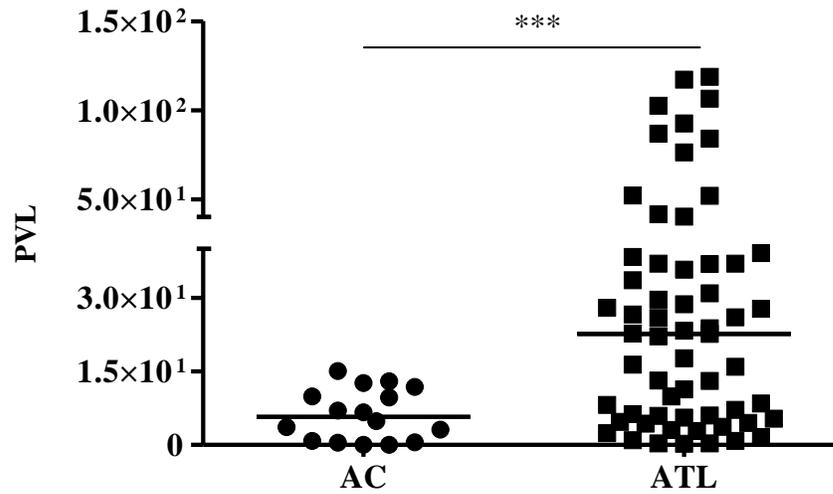


Figura 14: Quantificação absoluta por PCR em tempo real dos níveis de carga proviral. Análise dos níveis de carga proviral dos pacientes com ATL e dos portadores assintomáticos utilizando o teste estatístico Mann-Whitney.

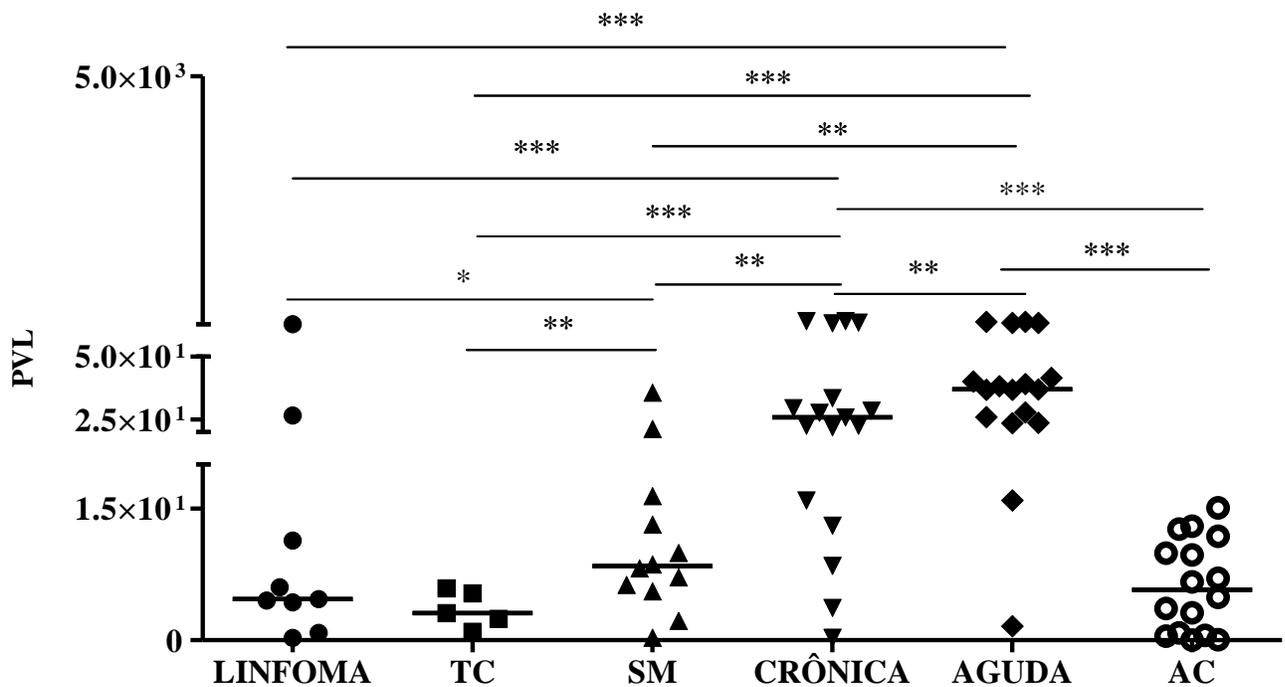


Figura 15: Quantificação absoluta por PCR em tempo real dos níveis de carga proviral. Análise dos níveis de carga proviral dos pacientes com ATL nas diferentes formas clínicas e dos portadores assintomáticos utilizando o teste estatístico Mann-Whitney.

6.1.2. Carga proviral e o nível de linfocitose em pacientes com ATL

A mediana da contagem dos linfócitos nos 60 pacientes com ATL foi de $5,01 \times 10^9/L$. Uma correlação positiva foi observada entre a carga proviral e os níveis de linfócitos no sangue periférico ($p < 0,0001$, $r = 0,722$, teste de Spearman) (Figura 16), quando todos os pacientes com ATL foram considerados. Os tipos agudo e crônico apresentaram acentuada linfocitose com mediana de contagem de linfocitose de $51,72$ e $6,90 \times 10^9/L$, respectivamente.

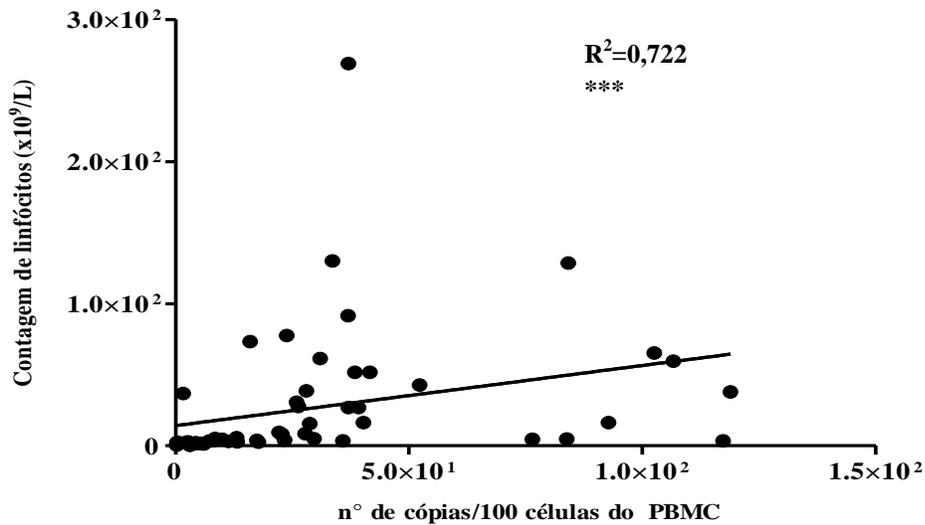


Figura 16: Análise de correlação entre a carga proviral e o nível de linfócitos nos pacientes com ATL utilizando o teste estatístico Spearman's rank.

6.1.3. A carga proviral e a sobrevida nos pacientes com ATL

A fim de analisar se a carga proviral foi relacionada com a sobrevida em pacientes com ATL, as curvas de sobrevida para as diferentes formas clínicas foram comparadas. Apesar do fato de que os níveis de carga proviral nos tipos agudo e crônico tenham sido as mais altas, a sobrevida, em pacientes agudos foi mais baixa do que em pacientes crônicos (log-rank, $p=0,0019$). A sobrevida também foi menor nos pacientes com a forma tumoral primária de pele quando comparado com pacientes com a forma clínica *smoldering* (log-rank, $p=0,0025$), embora a carga proviral na forma *smoldering* tenha sido maior que na tumoral primária de pele. Além disso, a sobrevida na forma crônica e *smoldering* foram semelhantes enquanto a carga proviral na forma crônica foi maior do que a *smoldering*. A sobrevida em pacientes com a forma linfomatosa foi tão baixa quanto na aguda (log-rank, $p=0,8117$). Porém, a carga proviral do tipo linfoma é menor a respeito da forma aguda. A sobrevida para os cinco tipos clínicos incluídos neste estudo corroborou com os relatos anteriores, na Bahia, Brasil (BITTENCOURT et al., 2007).

Tabela 7: Sobrevida dos pacientes com ATL nas diferentes formas clínicas.

Tipo clínico (sobrevida)	Valor de p
Crônica > Aguda	$p=0,0019$
<i>Smoldering</i> > TC	$p=0,0025$

6.1.4. Carga proviral e a associação da ATL com HAM/TSP

Comparamos a carga proviral nos pacientes com ATL com e sem a associação com HAM/TSP. Dos 60 pacientes com ATL, 11 foram diagnosticados com HAM/TSP. Três deles foram classificados como crônica e oito como *smoldering*. Na forma crônica, a mediana da carga proviral nos pacientes com e sem HAM / TSP foi semelhante e estas duas formas clínicas foram estatisticamente diferentes dos assintomáticos ($p=0,0086$ e $p=0,0013$, teste de Mann-Whitney). Na forma *smoldering*, a mediana da carga proviral do subgrupo com HAM/TSP e do subgrupo sem mielopatia também foram semelhantes, mas apenas o subgrupo associado com HAM/TSP apresentou maior mediana de carga proviral quando comparado com os portadores assintomáticos ($p=0,0184$, teste de Mann-Whitney U, figura 17). Esta diferença não foi observada nos pacientes *smoldering* sem mielopatia.

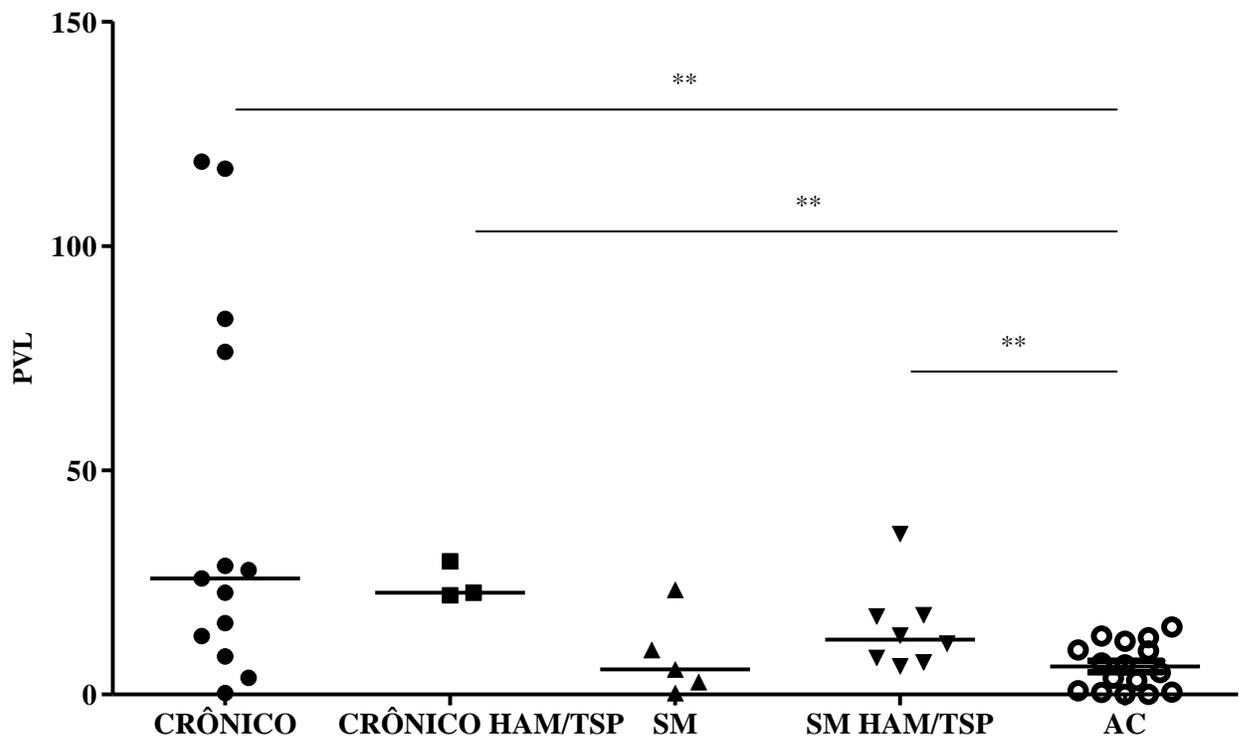


Figura 17: Quantificação absoluta por PCR em tempo real dos níveis de carga proviral. Análise dos níveis de carga proviral dos pacientes com ATL e dos pacientes com ATL associada com HAM/TSP utilizando o teste estatístico Mann-Whitney.

6.1.5. Relação entre o envolvimento cutâneo, a idade no momento do diagnóstico e a carga proviral

Avaliou-se a relação entre a carga proviral e presença ou ausência de lesões de pele nas formas aguda, crônica e linfoma. Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de carga proviral entre pacientes com ou sem envolvimento cutâneo. Considerando a idade no momento do diagnóstico, não foram observadas diferenças entre os tipos clínicos. A mediana de idade no momento do diagnóstico para os pacientes com ATL incluídos foi de 48 anos. Este parâmetro foi semelhante entre os tipos clínicos e não foi correlacionada com a carga proviral.

6.2. CAPÍTULO 2: Estudo da expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* na ATL.

6.2.1. Avaliação dos genes de referência HPRT e β -actina.

Foi avaliada a expressão de dois genes constitutivos humanos, o HPRT e a β -actina. Observamos que os valores dos dois genes mostraram a mesma tendência como é mostrado na figura 18. Porém, os valores de β -actina foram mais uniformes em relação ao HPRT, com isso, resolvemos utilizar a β -actina como gene de referência para normalizar os resultados da expressão dos genes virais.

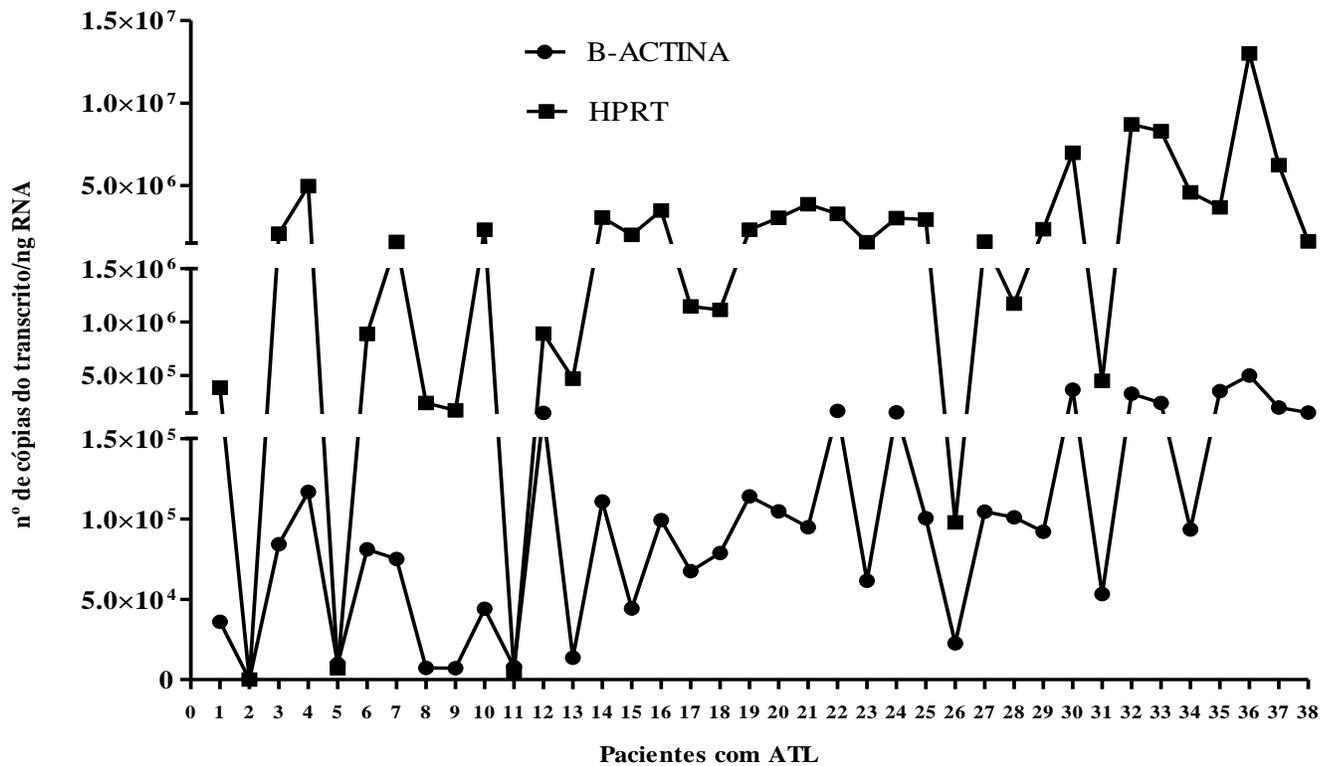


Figura 18: Quantificação absoluta realizada por PCR em tempo real utilizando 1µg de cDNA para cada gene. Análise dos níveis de expressão dos genes de referência HPRT e β -actina. Cada ponto do eixo das abscissas corresponde a um paciente com ATL.

6.2.2. Expressão dos genes *HBZ* (transcritos *HBZ* e *HBZ-SI*) e *tax* nos pacientes com ATL e nos portadores assintomáticos.

Analisamos a expressão normalizada dos genes estudados nos pacientes com ATL e observamos que a expressão do transcrito *HBZ-SI* foi maior que a expressão do transcrito *HBZ* (Figura 19), com mediana de 0,06400 cópias de mRNA por 1µg de RNA total e 0,001123 cópias de mRNA respectivamente ($p < 0,0001$, teste Mann Whitney). O gene *tax* apresentou mediana de expressão normalizada de 0,0009187 cópias de mRNA. Este valor foi estatisticamente menor que a expressão do gene *HBZ*, quando considerado apenas o transcrito *HBZ-SI* ($p < 0,0001$, teste Mann Whitney), porém para o transcrito *HBZ* não houve diferença. Nos portadores assintomáticos, os níveis de expressão do gene *tax* e do transcrito *HBZ* foram similares com medianas de 0,0004682 e 0,0004469 cópias de mRNA, respectivamente, porém menores que a mediana do nível de expressão observada para o transcrito *HBZ-SI* ($p = 0,0003$ e $p = 0,0003$, respectivamente, teste Mann Whitney). Quando foram comparados os resultados entre os pacientes com ATL e os portadores assintomáticos, foi observado um nível mais elevado de expressão do gene *tax* e do transcrito *HBZ-SI* nos pacientes com ATL ($p = 0,0449$ e $p = 0,0109$, respectivamente).

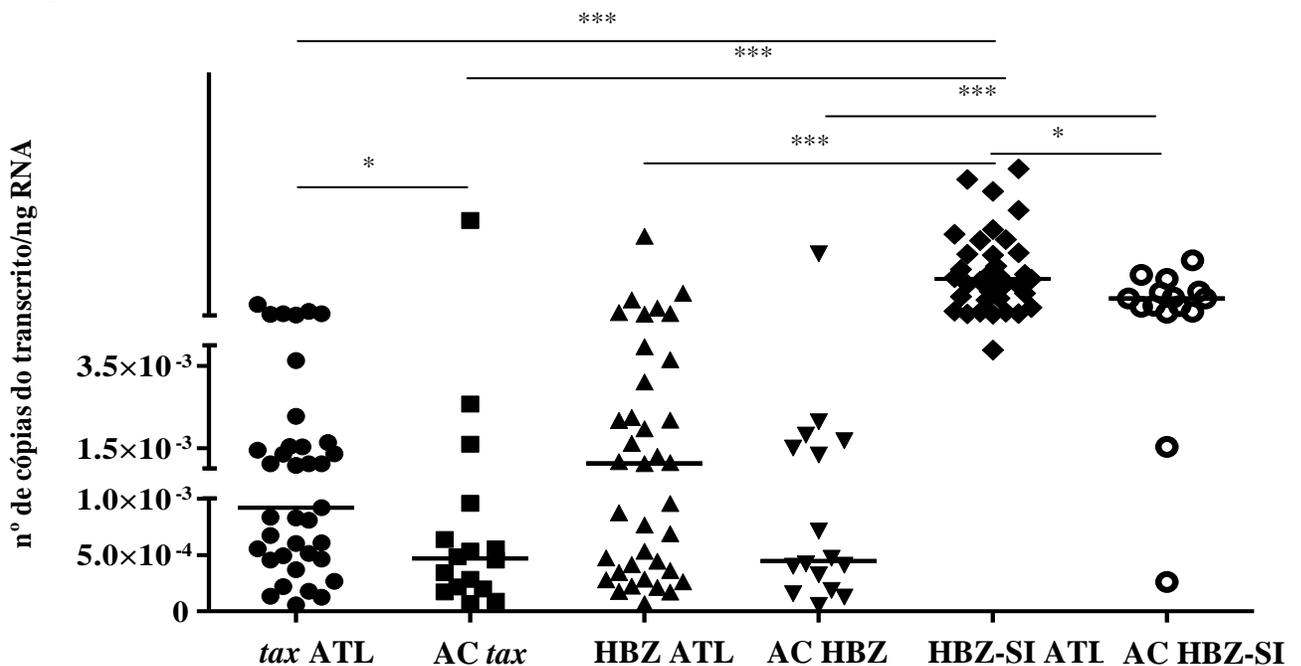


Figura 19: Quantificação absoluta por PCR em tempo real da expressão dos genes *HBZ* (transcritos *HBZ* e *HBZ-SI*) e *tax*. Análise dos níveis de expressão normalizada destes genes nos pacientes com ATL e portadores assintomáticos utilizando o teste estatístico Mann-Whitney.

6.2.3. Expressão dos genes virais *HBZ* (transcritos *HBZ* e *HBZ-SI*) e *tax*, ajustada pela carga proviral, nos pacientes com ATL e nos portadores assintomáticos.

Para estimar a expressão dos genes *tax* e *HBZ* por número de células infectadas, foi dividida a quantidade absoluta e normalizada do número de transcrito pela carga proviral expressa por 100 PBMCs (Figura 20). O nível de expressão dos genes após o ajuste dos portadores assintomáticos foi estatisticamente maior tanto para o gene *tax* ($p=0,0080$) como para os transcritos *HBZ* e *HBZ-SI* ($p=0,0124$ e $p=0,0255$, respectivamente).

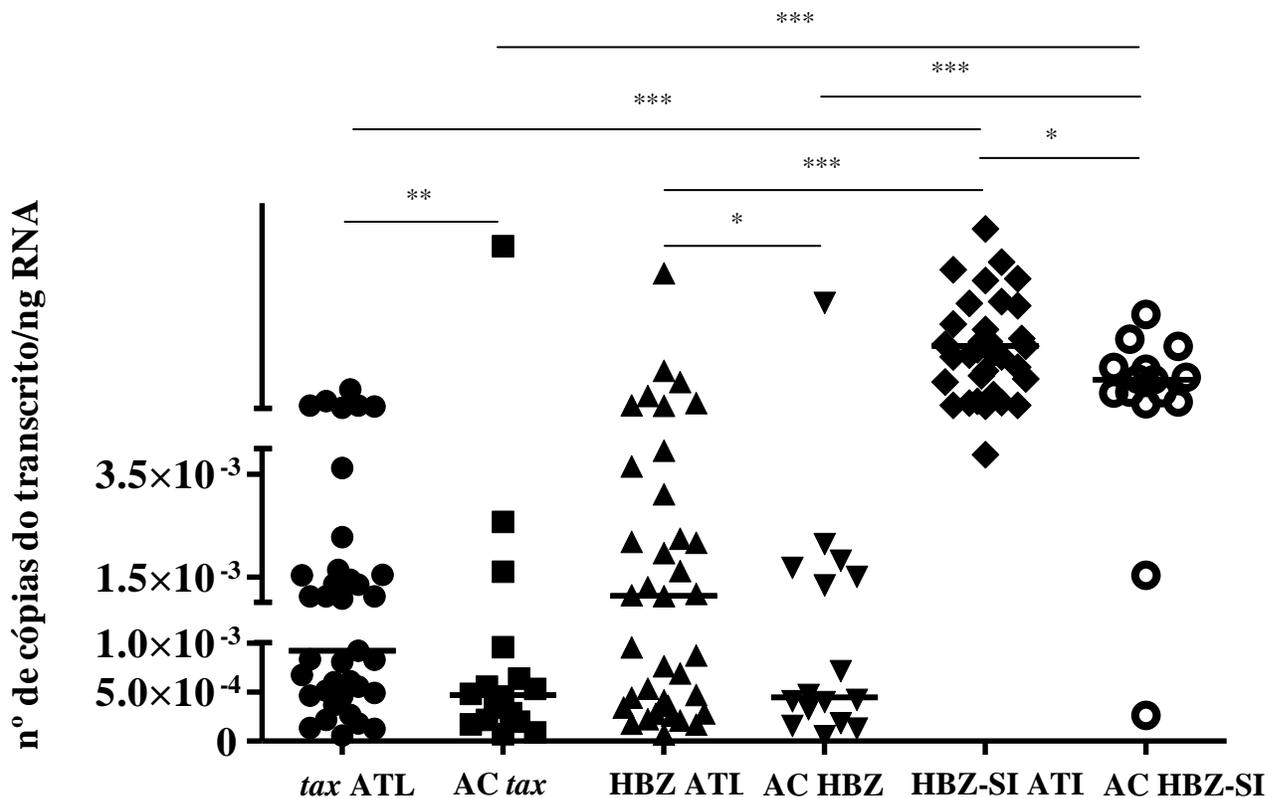


Figura 20: Quantificação absoluta por PCR em tempo real da expressão dos genes *tax* e *HBZ* (transcritos *HBZ* e *HBZ-SI*). Análise dos níveis de expressão normalizada destes genes, ajustada pela carga proviral, nos pacientes com ATL e nos portadores assintomáticos utilizando o teste estatístico Mann-Whitney.

6.2.4. Correlação entre os níveis de expressão dos genes virais *tax* e *HBZ*.

Nos pacientes com ATL, a expressão do gene *tax* correlacionou positivamente com a expressão do gene *HBZ*, transcritos HBZ ($p < 0,0001$, $r = 0,6930$, Figura 21A) e HBZ-SI ($p = 0,0014$, $r = 0,5057$, teste Spearman r , Figura 21B, respectivamente). Também foi observada correlação positiva entre os transcritos HBZ e HBZ-SI ($p = 0,0028$, $r = 0,4772$, teste Spearman r , Figura 21C).

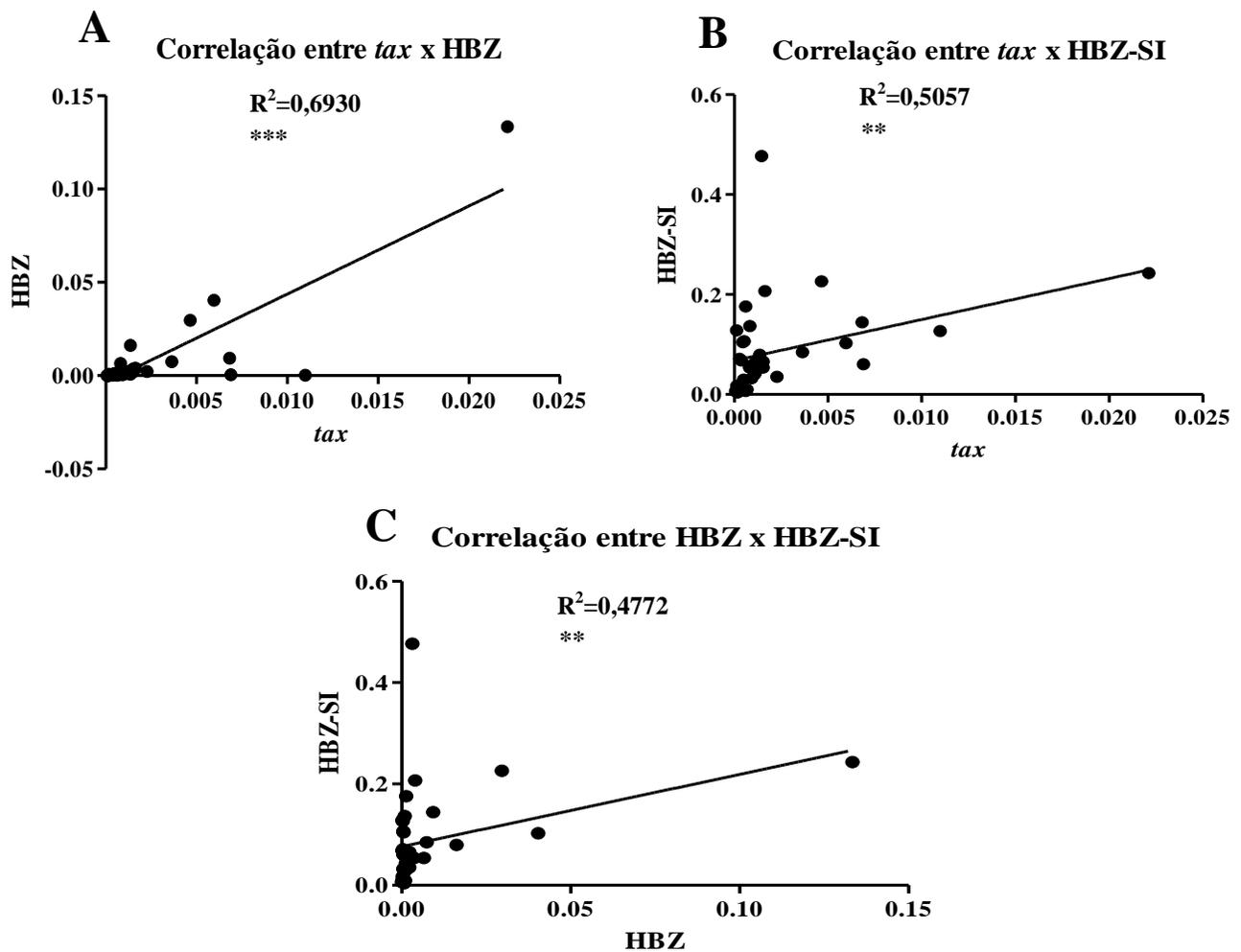


Figura 21: Análise de correlação entre os genes normalizados *tax* e *HBZ* utilizando o teste estatístico Spearman's rank. Na figura observa-se: (A) Correlação da expressão do gene *tax* e a expressão do transcrito HBZ; (B) Correlação da expressão do gene *tax* e a expressão do transcrito HBZ-SI; (C) Correlação da expressão dos transcritos HBZ e HBZ-SI.

6.2.5. Correlações entre a expressão dos genes virais *HBZ* e *tax* e a carga proviral.

A extração de RNA foi feita a partir das PBMCs e para avaliar se os níveis de expressão dos genes virais estavam relacionados com a quantidade de células infectadas na amostra de partida ou com uma maior expressão destes genes por célula infectada, foi correlacionada à expressão dos genes virais com a carga proviral. A mediana da carga proviral (expressa como número de cópias do transcrito/PVL) nos pacientes de ATL foi de 29,19 (9,199 – 49,59).

Para os pacientes com ATL, houve correlação positiva entre a carga proviral e o gene *tax* ($p < 0,0001$, $r = 0,6432$, teste Spearman r) e o transcrito *HBZ* ($p < 0,0001$, $r = 0,6432$, teste Spearman r) (Figura 22A e B). Já com o transcrito *HBZ-SI* não foi observada correlação ($p = 0,0647$, $r = 0,3112$, teste Spearman r) (Figura 22C).

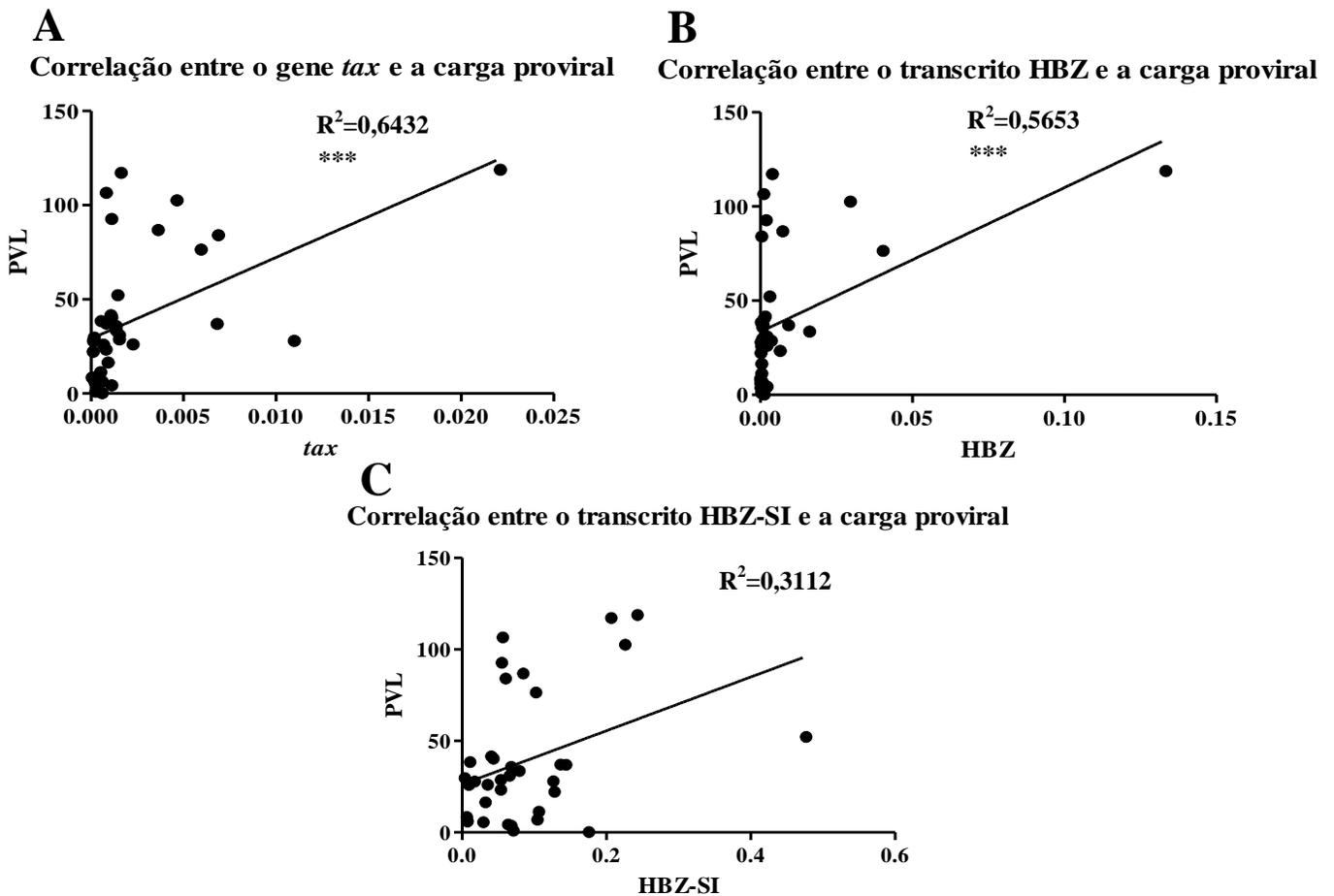


Figura 22: Análise de correlação entre os genes normalizados *tax* e *HBZ* e a carga proviral utilizando o teste estatístico Spearman's rank. Correlação entre o nível de expressão do gene *tax* e a carga proviral (A) e do gene *HBZ* (transcritos *HBZ* (B) e *HBZ-SI* (C)) e a carga proviral nos pacientes com ATL.

6.2.6. Expressão dos genes *HBZ* (transcritos *HBZ* e *HBZ-SI*) e *tax* nos pacientes com ATL nas diferentes formas clínicas e nos portadores assintomáticos.

Os pacientes foram subdivididos por formas clínicas e os valores da expressão dos genes estudados. Estas formas clínicas foram comparadas entre elas e em relação aos portadores assintomáticos. A respeito do gene *tax* (Figura 23A), a forma clínica aguda com uma mediana de 0,001495 cópias de mRNA foi estatisticamente maior que as formas *smoldering* e tumoral primária de pele com mediana de 0,000705 e 0,00027 cópias de mRNA ($p=0,0374$ e $p=0,0140$, respectivamente). As formas crônica e linfoma apresentaram medianas de 0,00067 e 0,00051 respectivamente, similares as das outras formas clínicas. Quando comparadas com os portadores assintomáticos, somente se observou diferença significativa com a forma aguda ($p=0,0017$). O nível de expressão deste gene nas outras formas clínicas foi similar ao observado nos assintomáticos.

Em relação ao transcrito *HBZ*, também foi observado um nível de expressão maior na forma aguda com mediana de 0,001795 cópias de mRNA (Figura 23B), porém, este valor não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparamos com o observado nas outras formas clínicas. Nos portadores assintomáticos, o gene *HBZ* demonstrou níveis de expressão menores quando comparados unicamente com a forma aguda ($p=0,0438$), porém similares quando comparados com as outras formas clínicas.

Já a expressão do transcrito *HBZ-SI* nas diferentes formas clínicas apresentou valor similar, sendo na forma aguda de 0,06302 cópias de mRNA, na crônica de 0,05374, na *smoldering* de 0,06086 cópias de mRNA, na tumoral primária de pele de 0,07115 cópias de mRNA e na linfomatosa de 0,0640 cópias de mRNA (Figura 23C). Somente a forma aguda apresentou nível de expressão deste gene significativamente maior a respeito dos portadores assintomáticos ($p=0,0028$).

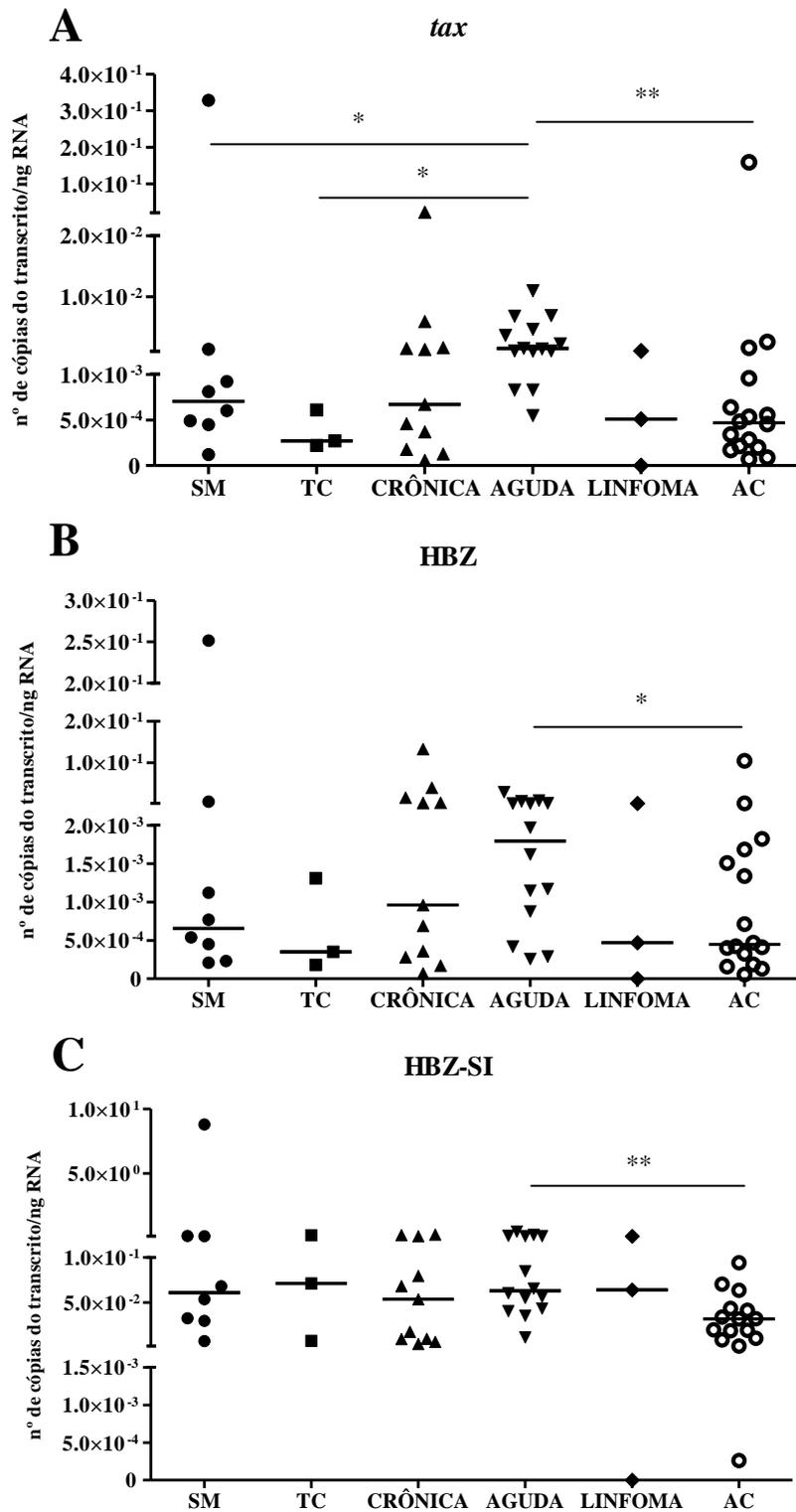


Figura 23: Quantificação absoluta por PCR em tempo real dos genes *tax* e *HBZ* (transcritos *HBZ* e *HBZ-SI*). Análise dos níveis de expressão normalizada do gene *tax* (A) e do gene *HBZ* (transcritos *HBZ* (B) e *HBZ-SI* (C)), nos pacientes com ATL nas diferentes formas clínicas e nos portadores assintomáticos utilizando o teste estatístico Mann-Whitney.

6.2.7. Expressão dos genes *HBZ* (transcritos *HBZ* e *HBZ-SI*) e *tax*, ajustada pela carga proviral, nos pacientes com ATL nas diferentes formas clínicas e nos portadores assintomáticos.

Após separar as amostras por formas clínicas comparamos os valores, normalizados e ajustados pela carga proviral, da expressão viral com os portadores assintomáticos (Figura 24A). A respeito do gene *tax*, as medianas dos grupos estudados foram para a forma aguda de 0,00003479 cópias de mRNA pela PVL, para a crônica de 0,00003304 cópias de mRNA/PVL, para a linfomatosa de 0,00004532 cópias de mRNA/PVL, para a forma tumoral primária de 0,0002738 cópias de mRNA/PVL. Nos portadores assintomáticos a mediana foi de 0,0001608 cópias de mRNA/PVL. Quando estes valores foram comparados somente foram observadas entre os portadores assintomáticos e as formas aguda e crônica, que foram menores, com valores de $p=0,0094$ e $p=0,0084$, respectivamente.

Na expressão do transcrito *HBZ*, a mediana dos valores da expressão para este transcrito foram 0,00003395 cópias de mRNA/PVL para a forma aguda, 0,00004010 cópias de mRNA/PVL para a forma crônica, 0,00004184 cópias de mRNA/PVL para a forma linfomatosa e 0,0003548 cópias de mRNA/PVL para a forma tumoral primária de pele. Para os portadores assintomáticos, o valor foi de 0,0001695 cópias de mRNA/PVL (Figura 24B). Somente foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os portadores assintomáticos e a forma clínica aguda ($p=0,0017$).

Já na expressão do transcrito *HBZ-SI* foi observado que as formas aguda e crônica apresentaram valores menores de expressão que o observado na forma *smoldering* ($p=0,0374$ e $p=0,0434$, respectivamente) e nos portadores assintomáticos ($p=0,0094$ e $p=0,0101$, respectivamente). A forma tumoral primária de pele e a linfomatosa apresentaram medianas similares que não foram estatisticamente diferentes as dos outros grupos (Figura 24C).

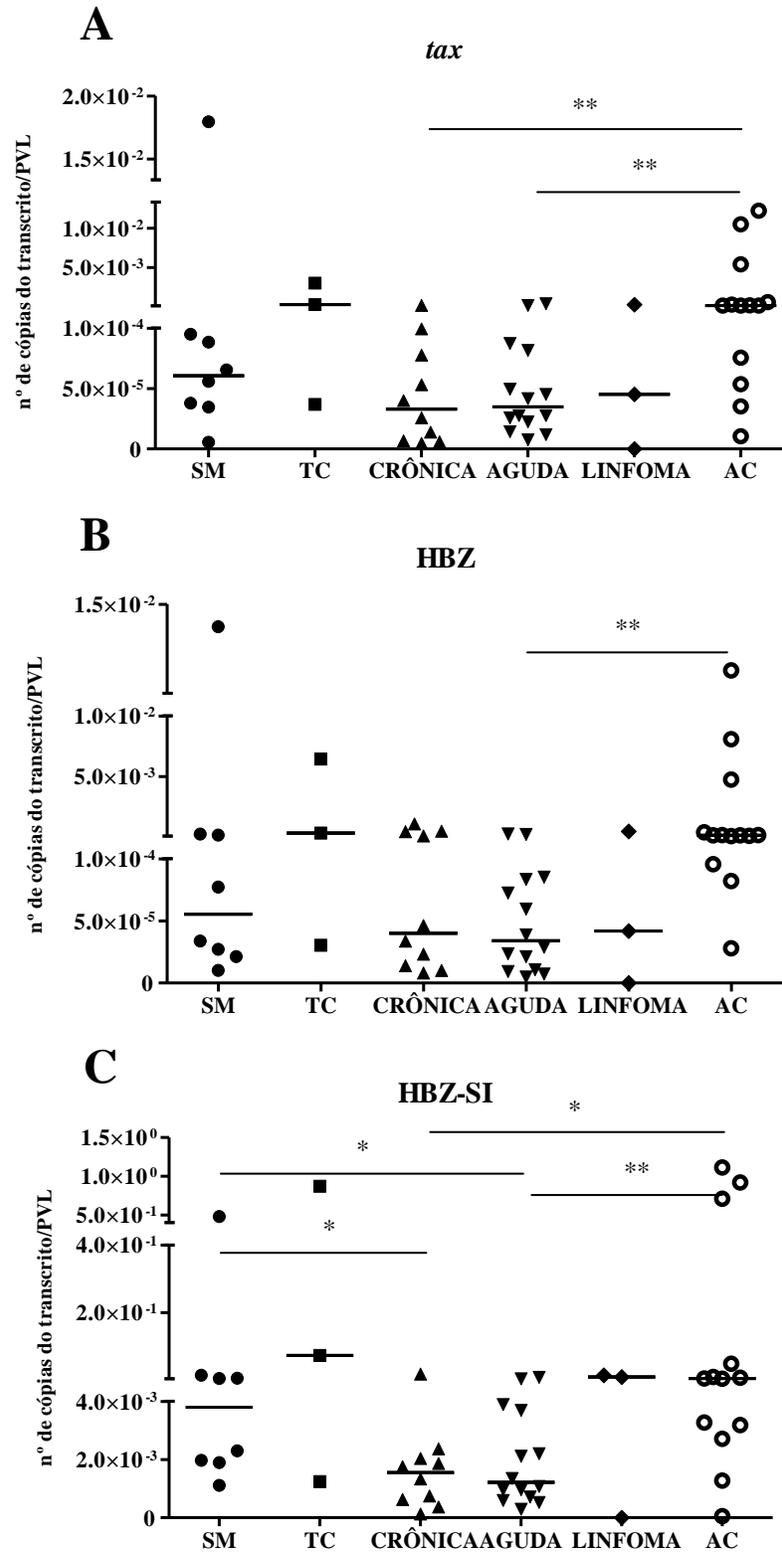


Figura 24: Quantificação absoluta por PCR em tempo real dos genes *tax* e *HBZ* (transcritos *HBZ* e *HBZ-SI*). Análise dos níveis de expressão normalizada dos genes *tax* (A) e *HBZ* (transcritos *HBZ* (B) e *HBZ-SI* (C)), ajustada pela carga proviral nos pacientes com ATL nas diferentes formas clínicas e nos portadores assintomáticos utilizando o teste estatístico Mann-Whitney.

7. DISCUSSÃO

7.1. CAPÍTULO 1: Estudo da carga proviral na ATL.

O nível de carga proviral nos portadores do HTLV-1 tem sido considerado como um importante marcador para o desenvolvimento de doenças associadas a este retrovírus. Altos níveis de carga proviral foram associados com risco para o desenvolvimento da HAM/TSP e da DIH (NAGAI et al., 1998; PRIMO et al., 2009). Alguns autores sugerem um possível papel da carga proviral no desenvolvimento da ATL (OKAYAMA et al, 2004; IWANAGA et al, 2010). No presente estudo, níveis altos de carga proviral também foram associados aos pacientes de ATL quando comparados com os portadores assintomáticos. Este resultado está de acordo com estudos prévios, como o realizado na Jamaica (MANNIS et al., 1999). Porém, mostramos neste estudo que a carga proviral correlacionou-se positivamente com a linfocitose, de modo que aqueles pacientes que tiveram maior número de linfócitos no sangue periférico também apresentaram maior carga proviral, sugerindo que a população aumentada de linfócitos correspondia às células infectadas pelo retrovírus.

As diferentes formas clínicas na ATL se caracterizam, entre outros parâmetros, por apresentar diferentes níveis de linfocitose (SHIMOYAMA et al., 1990; BITTENCOURT et al., 2007). Deste modo, quando os pacientes com ATL incluídos neste estudo foram subdivididos por formas clínicas e comparadas as medianas de carga proviral entre os subgrupos, aquelas formas clínicas que apresentaram maior linfocitose, as formas agudas e crônicas, também apresentaram maior carga proviral. Além disso, as medianas das suas cargas provirais foram maiores que a observada em portadores assintomáticos. Entretanto, as formas linfomatosas, *smoldering* e tumoral primária de pele, que não mostram linfocitose, apresentaram carga proviral semelhante com os portadores assintomáticos adultos. A este respeito, a percentagem de células CD4 + no PBMC dos pacientes agudos e crônicos é mais elevada do que nos tipos *smoldering*, linfoma e tumoral primária de pele (dados não mostrados), tipos celulares que representam os principais alvos celulares do HTLV-1. Estes resultados também podem sugerir que o desenvolvimento das formas clínicas linfomatosas, *smoldering* e tumoral primária de pele pode não estar associado a um aumento significativo da capacidade proliferativa das células infectadas tumorais no sangue periférico ou a alguma outra característica ou capacidade que adquire o clone de células

infectadas quando se transforma neoplasticamente, como por exemplo um tropismo diferenciado para linfonodo ou pele. Deste modo, as diferentes alterações genéticas ou epigenéticas adquiridas pela célula ATL podem estar relacionadas com um comportamento diferenciado e, portanto, com a manifestação clínica diferente. Neste sentido, mutações pontuais em genes supressores de tumores como TP53 e deleções nos genes que codificam para as proteínas p15 e p16 foram observadas principalmente em pacientes com formas agudas com elevada linfocitose (SAKASHITA et al., 1992; dados do nosso grupo).

Um dado interessante em nosso estudo foi observar que a carga proviral não se relaciona com a sobrevida e, portanto, não é necessariamente um fator de mal prognóstico. As formas linfoma, aguda e tumoral primária de pele apresentam pior prognóstico a respeito das formas crônica e *smoldering*, que são menos agressivas (BITTENCOURT et al., 2007). Este resultado sugere que o prognóstico na ATL pode estar relacionado com outros fatores genotípicos ou fenotípicos do clone neoplásico infectado diferente da sua capacidade de proliferar.

Também foi interessante observar que os pacientes com forma *smoldering* somente apresentaram carga proviral maior que os portadores assintomáticos quando manifestavam simultaneamente HAM/TSP, o que sugere que este aumento está relacionado com a manifestação da mielopatia e não da ATL. Em todos estes pacientes, a HAM/TSP foi diagnosticada antes da neoplasia, o que pode levar a sugerir que estes pacientes já tinham uma carga viral mais elevada que os portadores assintomáticos antes de manifestar a ATL. Não temos estes dados, pois estes pacientes já chegaram ao ambulatório do HUPES com manifestações de ATL. A associação entre HAM/TSP e ATL é raramente reportada na literatura e não existem estudos neste sentido. Também não existem evidências na literatura sobre a possibilidade de que a manifestação da HAM/TSP possa predispor ao desenvolvimento da ATL. Porém, um dado que chama a atenção é que na Bahia a maioria dos casos de pacientes com ATL que também manifestam HAM/TSP são da forma *smoldering* (BITTENCOURT et al., 2009). Deste modo, não podemos descartar que a elevada carga proviral associada à manifestação de HAM/TSP que antecede ao desenvolvimento da ATL nestes casos possa favorecer à ocorrência de algum tipo de alteração molecular que favoreça a manifestação desta forma clínica.

Apesar de carga proviral ser considerada um dos principais indicadores para o desenvolvimento da ATL, os nossos resultados indicam que para o diagnóstico precoce da ATL, além da carga proviral, outros parâmetros clínicos e laboratoriais precisam ser considerados no

acompanhamento dos portadores assintomáticos, principalmente no que se refere às formas *smoldering*, linfomatosa e tumoral primária de pele. A respeito das formas aguda e crônica, a linfocitose aumentada acompanhada por um aumento da carga proviral pode ser um indicativo para a suspeita do seu desenvolvimento fazendo-se necessário uma maior investigação clínica e laboratorial do portador. Também pode ser útil para os casos de evolução de outra forma clínica para a forma aguda.

7.2. CAPÍTULO 2: Estudo da expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* na ATL.

Após o estabelecimento da ATL como uma entidade clínica distinta e a identificação do HTLV-1 como um agente causador desta neoplasia, estudos tem sido realizados para esclarecer os mecanismos de patogênese do HTLV-1. Porém, ainda não se conhece o papel dos produtos dos genes virais no desenvolvimento da ATL e na determinação da forma clínica manifestada pelo paciente. Os principais genes virais relacionados com a oncogênese do HTLV-1 são os genes *tax* e *HBZ* (YOSHIDA et al., 2001; SATOU et al., 2006; ZHAO AND MATSUOKA, 2012).

Como observado previamente na literatura em outras áreas endêmicas para o HTLV-1 (SAITO et al., 2009; SATOU et al., 2006, USUI et al., 2008), todos os pacientes de ATL incluídos neste estudo, apresentaram expressão do gene *HBZ* e níveis muito baixos ou indetectáveis do gene *tax*. Na ATL e nos portadores assintomáticos, o nível de expressão do transcrito HBZ-SI foi maior do que o nível de expressão do gene *tax*. Outros autores também observaram resultados similares para pacientes com ATL, com HAM/TSP e portadores assintomáticos (SAITO et al., 2009; USUI et al., 2008). Deste modo, os nossos resultados também sugerem que o gene *HBZ* poderia ter um papel mais relevante na patogênese da infecção pelo HTLV-1 do que o gene *tax*, como foi apontado na literatura (ARNOLD, 2008; ZHAO AND MATSUOKA, 2012), na estimulação da proliferação das células infectadas e na manutenção da carga proviral.

O nosso estudo também esta de acordo com estudos prévios que mostraram que os níveis de expressão do transcrito HBZ-SI são maiores que o do transcrito HBZ nos portadores do HTLV-1 (SATOU et al., 2006; YOSHIDA et al., 2008; USUI et al., 2008). Este transcrito, e não o HBZ parece ser o responsável pela proliferação das células infectadas (YOSHIDA et al., 2008).

Nossos resultados também apontam o transcrito HBZ-SI como mais relevante na patogênese do HTLV-1.

Em 2008, Usui e colaboradores reportaram em portadores do HTLV-1 uma correlação positiva entre a carga proviral e a expressão do transcrito HBZ-SI, indicando a importância de considerar a carga proviral, que é um indicativo do número de células infectadas contidas na amostra avaliada, para interpretação dos valores de expressão deste transcrito. No presente estudo, a expressão dos transcritos HBZ e *tax* na ATL correlacionou com a carga proviral, indicando, portanto, que o nível maior de expressão destes transcritos foi devido à um maior número de células infectadas na amostra avaliada. A correlação positiva entre a expressão de *tax* e a carga proviral na ATL também foi observada previamente em pacientes de outras áreas endêmicas, na HAM/TSP e em portadores assintomáticos (SAITO et al., 2009; USUI et al., 2008; ANDRADE et al., 2012). No entanto, o transcrito HBZ-SI não correlacionou com a carga proviral. Isto foi mostrado também por Saito e colaboradores, 2009, e sugere que nos pacientes com ATL estudados a expressão aumentada pode estar relacionada com algum mecanismo de regulação deste transcrito nas células tumorais infectadas que leve a sua expressão diferenciada. Esta correlação foi mostrada para os portadores assintomáticos e para a HAM/TSP (ANDRADE et al., 2012; SAITO et al., 2009), o que pode sugerir uma regulação específica deste gene nas diferentes condições clínicas da infecção por este retrovírus.

Os níveis dos transcritos HBZ e HBZ-SI correlacionaram positivamente entre eles e também cada um deles com a expressão do gene *tax*. Ainda que esta correlação não é muito forte, poderia sugerir que a regulação da expressão do gene *tax* e do gene *HBZ* pode acontecer por mecanismos similares, ou que a expressão de um deles estimule a expressão do outro (LANDRY et al., 2009; CHOUDHARY et al., 2011), e que a proteína HBZ não esteja inibindo nestes casos a expressão do gene *tax*, como proposto na literatura (MATSUOKA & JEANG, 2007; ZHAO et al., 2009; YAN et al., 2009). Outros autores também mostraram esta correlação para os portadores assintomáticos e para os pacientes com HAM/TSP (ANDRADE et al., 2012) e, como comentado por estes autores, no nosso trabalho também não podemos assegurar se a expressão dos dois genes acontece nas mesmas células ou em clones diferentes.

A relação entre a expressão dos genes *tax* e *HBZ* e a manifestação de doenças associadas ao HTLV-1 começou a ser recentemente estudada na literatura (SAITO et al., 2009; USUI et al., 2008). O presente estudo corrobora esses dados, uma vez que observou maior nível de expressão

do transcrito HBZ-SI nos pacientes com ATL quando comparados com os portadores assintomáticos. Porém, discorda na inversão desta relação quando os valores de expressão foram divididos pela carga proviral, o que proporciona a expressão do transcrito por célula infectada.

Nos estudos japoneses, quando o valor de expressão foi dividido pela carga proviral esta diferença desapareceu, sugerindo que as células ATL e as células dos portadores assintomáticos expressam este transcrito a iguais níveis independentemente da condição clínica do portador. Na HAM/TSP, isto também foi reportado (SAITO et al., 2009; ANDRADE et al., 2012). Os nossos dados sugerem que os portadores assintomáticos expressaram maiores níveis de transcrito por célula infectada que os pacientes com ATL. Este dado poderia indicar que o transcrito HBZ-SI é mais necessário para a estimulação da proliferação da célula infectada e manutenção da carga proviral nos portadores assintomáticos que na ATL, onde a célula tumoral infectada pode não ser tão dependente da estimulação viral para a sua proliferação pela ocorrência de possíveis alterações genéticas e epigenéticas adquiridas na sua transformação neoplásica. Isto também poderia ser sugerido para o transcrito HBZ porque, embora não observamos diferenças no nível da expressão deste em valores não normalizados pela carga proviral entre pacientes de ATL e portadores assintomáticos, esta diferença aparece quando os valores são divididos pela carga proviral, o que indica que a expressão do transcrito HBZ por célula infetada é maior nos portadores assintomáticos que nos pacientes com ATL.

A respeito do gene *tax*, mostramos uma discreta, ainda que significativa diferença nos níveis de expressão deste gene na ATL em relação com os portadores assintomáticos. Isto tinha sido também observado em pacientes com HAM/TSP, onde foram reportados níveis maiores de mRNA do gene *tax* em pacientes com maior comprometimento neurológico em comparação com portadores assintomáticos e considerado o nível de transcrição do gene *tax* como um fator preditor na HAM/TSP (YAMANO et al., 2002; ANDRADE et al., 2012). Porém, Saito e colaboradores em 2009, não observaram diferenças na expressão deste gene entre os pacientes com HAM/TSP, ATL e portadores assintomáticos. No nosso estudo, esta diferença se inverte quando os valores da expressão deste gene foram divididos pela carga proviral, situação em que os portadores assintomáticos passam a expressar maior nível de transcrito *tax* por célula infectada que os pacientes com ATL. Como sugerido para o gene *HBZ*, as células infectadas dos portadores assintomáticos poderiam ser mais dependentes da expressão do gene *tax* para estimular a sua proliferação e manter a carga proviral. Na literatura, a relação entre a expressão

de *tax* em função da carga proviral na ATL é controversa (USUI et al., 2008; SAITO et al., 2009). As diferenças entre os estudos disponíveis podem estar relacionadas com o número e características dos pacientes incluídos e com possíveis divergências nas metodologias utilizadas. Por outro lado, no caso do gene *tax* é importante a avaliação complementar do nível da proteína, para a qual foi atribuída função, considerando possíveis mecanismos de regulação pós-traducional de Tax (YAN et al., 2009; RENDE et al., 2012). A proteína Tax é capaz de estimular a proliferação e inibir a apoptose das células infectadas. 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 & GREEN, 2010).

É interessante destacar que o presente estudo inclui pacientes das cinco formas clínicas da ATL, e em todas elas, independentemente da sua agressividade, se observa a expressão do gene HBZ, principalmente do transcrito HBZ-SI. Os poucos estudos anteriores disponíveis (USUI et al., 2008) não especificavam as formas clínicas dos pacientes com ATL incluídos ou incluíram principalmente pacientes da forma aguda, uma das formas clínicas mais graves e poucos casos com forma crônica, não incluindo a forma *smoldering* (SATOU et al., 2006; MURATA et al., 2006). Estas formas são muito frequentes na Bahia (BITTENCOURT et al., 2007), porém são raramente diagnosticadas no Japão, de onde provem os trabalhos disponíveis na literatura. Deste modo, o presente estudo pode contribuir no conhecimento de como os produtos destes genes virais se relacionam com as diferentes formas clínicas da ATL.

O nível de expressão do gene *tax* diferiu entre algumas das formas clínicas da ATL, sendo maior na forma clínica aguda a respeito da *smoldering* e da tumoral primária de pele. Porém, estas diferenças desaparecem quando os valores de expressão são divididos pela carga proviral, indicando que entre as diferentes formas clínicas não há diferença na expressão deste transcrito por célula infectada. Somente as formas crônica e aguda que apresentam maior linfocitose, mostraram menor expressão deste gene por célula infectada quando comparadas com os portadores assintomáticos. Estas formas clínicas geralmente acumulam mais alterações genéticas e epigenéticas que estão relacionadas com maior proliferação das células tumorais (HATTA et al., 1999; NISHIMURA et al., 1995; dados do nosso grupo), o que reforçaria a hipótese de menor dependência da expressão deste gene viral para estimulação da proliferação da célula infectada na ATL. Por outro lado, a expressão deste gene não se relacionou com a gravidade, sendo que, as formas clínicas mais graves da ATL são a aguda, a linfomatosa e a tumoral primária de pele.

A respeito do transcrito HBZ, a forma aguda foi a única que apresentou níveis de expressão mais elevada que a dos portadores assintomáticos por apresentar maior carga proviral, pois esta relação se inverteu quando o valor foi dividido pela carga proviral. Os valores nas outras formas clínicas apresentaram muita dispersão.

A expressão do transcrito HBZ-SI por célula infectada foi maior na forma *smoldering* e nos portadores assintomáticos que nas formas agudas e crônicas. A carga proviral nos portadores assintomáticos e na forma *smoldering* é similar e esta última não apresenta linfocitose e, portanto, apresenta uma taxa de proliferação celular menor que a observada nas formas crônica e aguda. Possivelmente, esta forma é mais dependente da expressão do transcrito HBZ-SI para a estimulação das células tumorais infectadas, pois a nossa hipótese é que não acumula tantas alterações genéticas em genes supressores e oncogênese a respeito das formas aguda e crônica. Como discutido para a carga proviral, a oncogênese da forma *smoldering* pode estar mais associada a características fenotípicas adquiridas pela célula ao se transformar neoplasicamente relacionadas com tropismo cutâneo.

Infelizmente, o pequeno número de pacientes incluídos nas formas linfoma e tumoral primária de pele limitaram o estudo da expressão destes genes nestas formas clínicas. Não incluímos neste trabalho o estudo dos mecanismos que estão relacionados com a baixa expressão do gene *tax*. Esta foi relacionada na literatura como a ocorrência de mutações, deleções ou inserções no gene *tax* e hipermetilação ou deleção da região 5'LTR (MATSUOKA, 2005) e ainda com a regulação mediada pela proteína HBZ. Temos como perspectiva aprofundar este estudo avaliando os mecanismos envolvidos na regulação da expressão destes dois genes e dos demais genes localizados na região *pX* do genoma do HTLV-1.

8. CONCLUSÕES

- Os níveis de carga proviral na ATL correlacionam com a linfocitose;
- As formas linfoma e tumoral primária de pele apresentam níveis de carga viral similares aos portadores assintomáticos. Na ATL parece não existir uma relação entre os níveis da carga proviral e a gravidade da doença. A forma *smoldering* somente apresenta maior carga proviral a respeito dos assintomáticos quando esta associada à HAM/TSP;
- O gene *HBZ* se expressa em maiores níveis que o gene *tax* independentemente da condição clínica;
- A expressão dos genes *tax* e *HBZ* por célula infectada é menor nos pacientes com ATL do que nos portadores assintomáticos, porém a expressão destes genes varia nas diferentes formas clínicas da ATL.

9. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, R. G. et al. Strong correlation between tax and HBZ mRNA expression in HAM/TSP patients: Distinct markers for the neurologic disease. **J Clin Virol**, 2012.
- ARISAWA, K. et al. Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan. **International Journal of Cancer**, Estados Unidos, v.85, n.3, p.319-324, 2000.
- ARNOLD, J. **The Role Of Hbz In Htlv-1 Biology**. Dissertation (Graduate Research Associate The Department of Veterinary Biosciences), Graduate School of The Ohio State University, Columbus, Ohio, 2008.
- ARNOLD, J. et al. L. Human T-cell Leukemia Virus Type-1 Antisense-encoded Gene, *Hbz*, Promotes T Lymphocyte Proliferation. **Blood.**, 2008.
- BANGHAM, C. R. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. **J Gen Virol**. 84:3177-89, 2003.
- BARBOSA, H. S. et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma in northeastern Brazil: a clinical, histopathologic, and molecular study. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human**. v. 21, p. 65-71, 1999.
- BASBOUS, J. et al. The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. **J Biol Chem.**, 31;278(44):43620-7, 2003.
- BITTENCOURT, A. L. et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Bahia, Brazil: analysis of prognostic factors in a group of 70 patients. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 128, p. 875-882, 2007.
- BITTENCOURT, A. L.; FARRE, L. Leucemia/linfoma de células T do adulto. **An Bras Dermatol**. 83 (4): 351-9, 2008.
- BITTENCOURT, A. L.; H. S. BARBOSA, et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) presenting in the skin: clinical, histological and immunohistochemical features of 52 cases. **Acta Oncol**, v.48, n.4, p.598-604. 2009.
- CATALAN-SOARES, B. C.; CARNEIRO-PROIETTI A. B. F.; PROIETTI, F. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 926-931, maio/jun, 2005.
- CAVANAGH, M. H. et al. HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3'LTR are alternatively spliced and polyadenylated. **Retrovirology**, 3:15, 2006.

CESARMAN, E.; CHADBURN, A.; INGHIRAMI, G. et al. Structural and functional analysis of oncogenes and tumor suppressor genes in adult T-cell leukemia/lymphoma shows frequent p53 mutations. **Blood.**, 80:3205-3216, 1992.

CHOUDHARY, G.; RAUCH, D.; RATNER, L. The HTLV-1 hbz antisense gene indirectly promotes tax expression via down-regulation of p30-II mRNA. **Retrovirology**, 8(Suppl 1):A136, 2011.

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**, Estados Unidos, v. 34, n.5, p. 527-531, dez., 2003.

ETOH, K. I. et al. Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells in vivo. **Cancer Res.**, 57, 4862–4867, 1997.

FERREIRA, O. C. Jr; PLANELLES, V.; ROSENBLATT, J. D. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. **Blood Rev.**, 11(2):91-104, 1997.

FRANCHINI, G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. **Blood.**, 86(10):3619-39, 1995.

FRANCHINI, G.; STREICHER, H. Human T-cell leukaemia virus. *Baillieres Clin Haematol.*, 8(1):131-48, 1995.

FRANCHINI, G.; FUKUMOTO, R.; FULLEN, J. R. T-cell control by human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1. **Int J Hematol.**, 78:280-296, 2003.

FURUKAWA, Y. et al. Human T-cell Leukemia Virus Type-I (HTLV-1) Tax Is Expressed at the Same Level in Infected Cells of HTLV-1-Associated Myelopathy or Tropical Spastic Paraparesis Patients as in Asymptomatic Carriers but at a Lower Level in Adult T-cell Leukemia Cells. **Blood**, v. 85, n. 7, pp 1865-187, 1995.

GAUDRAY, G. et al. The complementary strand of HTLV-1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates the viral transcription. **J. Virol.** 76, 12813-12822, 2002.

GESSAIN, A. et al. G. Antibodies to human T-lymphotropic virus I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 2: 407-410, 1985.

GESSAIN, A.; SAAAL, F.; GOUT, O. High human T-cell lymphotropic virus type I proviral DNA load with polyclonal integration in peripheral blood mononuclear cells of French West Indies, Guianese, and African patients with tropical spastic paraparesis. **Blood**, 15, 428–433, 1990.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Front Microbiol**, v. 3, 388, 2012.

GRASSMANN, R.; ABOUD, M.; KUAN-THE, J. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. **Oncogene**, 24, 5976–5985, 2005.

HATTA, Y. et al. Detailed deletion mapping of the long arm of chromosome 6 in adult T-cell leukemia (ATL). **Blood**, 93: 613–616, 1999.

IARC. Human immunodeficiency viruses and human T-cell lymphotropic viruses. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, 67: 1–424. PMID:9190379, 1996.

IWANAGA, M. et al. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. **Blood**, v. 116, n. 8, 2010.

IZUMO, I. Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). **Neuropathology**, 30:480–5, 2010.

KANNAGI, M.; OHASHI, T.; HARASHIMA, N. et al. Immunological risks of adult T-cell leukemia at primary HTLV-I infection. **Trends Microbiol.**, 12:346-352, 2004.

KANNIAN, P.; GREEN, P. L. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. **Viruses - Review**, 2, 2037-2077, 2010.

KAPLAN, J. E., et al. The Retrovirus Epidemiology Donor Study Group. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2: association with viral load. **J. Acq. Imm. Defic. Syn. and H. Retrovir.** v. 12, p. 193-201, 1996.

KIM, S. J. et al. Transactivation of the transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) gene by human T lymphotropic virus type 1 tax: a potential mechanism for the increased production of TGF-beta 1 in adult T cell leukemia. **J Exp Med.**, 1;172(1):121-9, 1990.

KOIWA, T. et al. 5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Virology**, v. 76, p. 9389-9397, 2002.

LA GRENADE L. et al. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **Lancet**. v. 336 (8727), p. 1345-7, 1990.

LANDRY, S. et al. Upregulation of human T-cell leukemia virus type 1 antisense transcription by the viral tax protein. **J. Virol.** 83, 2048–2054, 2009.

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

LEE, T. H. et al. Antigens encoded by the 3'-terminal region of human T-cell leukemia virus: evidence for a functional gene. **Science.**, 5;226(4670):57-61, 1984.

- LI, X. H.; GAYNOR, R. B. Regulation of NF-kappaB by the HTLV-1 tax protein. **Gene Expr**, 7:233–45, 1999.
- LI, M.; GREEN, P. L. Detection and quantitation of HTLV-1 and HTLV-2 mRNA species by real-time RT-PCR. **J Virol Methods.**, 142(1-2):159-68, 2007.
- MANNS, A.; HISADA, M.; LA GRENADE, L. Human T-lymphotropic virus type I infection. **Lancet**, 353:1951–8, 1999.
- MATSUOKA, M. Infectious causes of cancer: targets of intervention. **Humana Press Inc.**, Totowa, NJ, 211-228, 2000.
- MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia. **Oncogene**, 22, 5131–5140, 2003.
- MATSUOKA, M. Human T-cell, leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology**, v. 2, n. 27, 2005.
- MATSUOKA, M.; JEANG, K. T. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infectivity and cellular transformation. **Nature Reviews Câncer**. v. 7, p. 270-280, 2007.
- MATSUZAKI, T.; M. NAKAGAWA; M. NAGAI; K. USUKU; I. HIGUCHI; K. ARIMURA; H. KUBOTA; S. IZUMO; S. AKIBA; M. OSAME. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. **J. Neurovirol.** 7:228-234, 2001.
- MESNARD, J. M. DEVAUX, C. Multiple control levels of cell proliferation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. **Virology**, 257(2):277-84, 1999.
- MESNARD J. M.; BARBEAU, B.; DEVAUX, C. HBZ, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia. **Blood**, 108:3979-3982, 2006.
- MOCHIZUKI, M. et al. HTLV-I uveitis. A distinct clinical entity caused by HTLV-I. **Jpn. J. Cancer Res.**, 83: 236-239, 1992.
- MUELLER, N. The epidemiology of HTLV-I infection. **Cancer Causes Control**, 2(1):37–52, 1991.
- NAGAI, M. et al. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. **J Neurovirol**, 4:586–93, 1998.
- NISHIMURA, S. et al. p53 gene mutation and loss of heterozygosity are associated with increased risk of disease progression in adult T cell leukemia. **Leukemia**, 9(4):598-604, 1995.
- NISHIOKA, K. et al. Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. **Lancet**, v. 1, p. 441, 1989.

NOSAKA, K.; MAEDA, M.; TAMIYA, S. et al. Increasing methylation of the CDKN2A gene is associated with the progression of adult T-cell leukemia. **Cancer Res.**, 60:1043-1048, 2000.

MURATA, K. et al. A Novel Alternative Splicing Isoform of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 bZIP Factor (HBZ-SI) Target Distinct Subnuclear Localization. **Journal of Virology**, v. 80, n. 5, p. 2495-2505, mar, 2006.

OKAYAMA, A. et al. Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia/lymphoma in asymptomatic carriers. **Int J Cancer**, 110:621-625, 2004.

OLIVEIRA, M. F. et al. Infective dermatitis associated with the Human T-cell Lymphotropic Virus Type I in Salvador, Bahia, Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, p. 90-96, 2005.

OSAME, M. et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**. 1986.

ONO, A. et al. Increased number of circulating HTLV-I infected cells in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-I uveitis patients: a quantitative polymerase chain reaction study. **Brit. J. Ophthalmol.**, 79, 270-276, 1995.

PAIS-CORREIA, A. M.; SACHSE, M.; GUADAGNINI, S.; ROBBIATI, V.; LASSERRE, R.; GESSAIN, A., et al. Biofilm like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. **Nat. Med.** 16, 83-89, 2009.

PIQUE, C.; JONES, K. S. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. **Front Microbiol.**, v. 3; 378, 2012.

POETKER, S. K. W. et al. Clinical Manifestations in Individuals with Recent Diagnosis of HTLV Type I Infection. **J Clin Virol.**, 51(1): 54-58, 2011.

POIESZ, B. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh blood and cultured lymphocytes of a patient a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. n.12, p. 7415-7419, 1980.

PRIMO, J. R. et al. Infective Dermatitis and Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis in Childhood and Adolescence. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 535-541, 2005.

PRIMO, J. et 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(8) 761-764, 2009.

PROIETTI, F. A., et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene**. v. 24, n. 39, p. 6058-6068, set 2005.

RATHSAM-PINHEIRO, R. H., et al. Ocular lesions in HTLV-1 infected patients from Salvador, State of Bahia: the city with the highest prevalence of this infection in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, 42(6): 633-7, 2009.

RENDE F. et al. Comparison of the genetic organization, expression strategies and oncogenic potential of HTLV-1 and HTLV-2. **Leuk. Res. Treat.**, 1–14,2012.

ROBERT-GUROFF, M.; NAKAO, Y.; NOTAKE, K.; ITO, Y.; SLISKI, A.; GALLO, R.C. Natural antibodies to human retrovirus HTLV in a cluster of Japanese patients with adult T cell leukemia. **Science**, 215(4535): 975-8, 1982.

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**, 6:19, 2009.

SAKASHITA, A. et al. Mutations of the p53 gene in adult T-cell leukemia. **Blood.**, 79:477-480, 1992.

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**, USA, v. 103, n. 3, p. 720-725, jan. 2006. USA 2006.

SCHREIBER, G. B. et al. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. **N Engl J Med**, 334: 1685–1690, 1996.

SEIKI, M. et al. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proc Natl Acad Sci USA**, 80(12): 3618–3622, 1983.

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, nov. 1991.

STUVER, S. O. et al. Heterosexual transmission of human T cell leukemia/lymphoma virus type I among married couples in southwestern Japan: an initial report from the Miyazaki Cohort Study. **J Infect Dis**, 167: 57–65, 1993.

TAJIMA, K.; HINUMA, Y. Epidemiology of HTLV-1/II in Japan and the world. **Gann Monogr Cancer Res**, 39: 129–149, 1992.

TAKATSUKI, K. et al. Adult T cell leukemia in Japan. In Topics in Hematology Edited by: Seno S, Takaku F, Irino S. Amsterdam, **Excerpta Medica**, 73-77, 1977.

TAKATSUKI, K. Discovery of adult T-cell leukemia. **Retrovirology**, 2:16, 2005.

TAKEDA, S. et al. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. **Int J Cancer**, 109:559-567, 2004.

TAMIYA, S. et al. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. **Blood**, 88: 3065–3073, 1996.

- TANIGUCHI, Y. et al. Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. **Retrovirology**, 2:64, 2005.
- TAYLOR, G. P.; MATSUOKA, M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. **Oncogene**. v. 24, n 39, p. 6047-6057, 2005.
- THÉBAULT, S. et al. HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. **FEBS Lett.**, 26;562(1-3):165-70, 2004.
- TSCHACHLER, E. et al. Human T-lymphotropic virus type I tax regulates the expression of the human lymphotoxin gene. **Blood**, v.81, n.1, p. 95-100, 1993.
- UCHIDA, T. et al. The CDKN2 gene alterations in various types of adult T-cell leukaemia. **Br J Haematol.**, 94:665-670, 1996.
- UCHIYAMA, T. et al. Adult T-cell leukemia: Clinical and hematologic features of 16 cases. **Blood**, 50:481-492, 1977.
- USUI, T. et al. Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (*HBZ*) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. **Retrovirology**, 5:34, 2008.
- XIE, L. et al. PDZ binding motif of HTLV-1 Tax promotes virus-mediated T-cell proliferation in vitro and persistence in vivo. **Blood**, 107:1980–8, 2006.
- YAKOVA, M. et al. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. **Retrovirology**, 2:4, 2005.
- YAMAGUCHI, K. et al. Elevated serum levels of soluble interleukin-2 receptors in HTLV-I-associated myelopathy. **J. Lab. clin. Med.**, 114, 407–410, 1989.
- YAMANO, et al. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8⁺ T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). **Blood**, v 99, n 1, 2002.
- YAMASHITA, M.; ACHIRON, A.; MIURA, T. et al.: HTLV-I from Iranian Mashhadi Jews in Israel is phylogenetically related to that of Japan, India, and South America rather than to that of Africa and Melanesia. **Virus Genes**, 10(1):85–90, 1995.
- YAN, P. et al. PDLIM2 suppresses human T-cell leukemia virus type I Tax-mediated tumorigenesis by targeting Tax into the nuclear matrix for proteasomal degradation. **Blood**, 113, 4370–4380, 2009.
- 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); 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. et al. Increased replication of HTLV-I in HTLV-I associated myelopathy. **Ann. Neurol.**, 26, 331, 1989.

YOSHIDA, M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. **Annu Rev Immunol**. 19:475-96, 2001.

YOSHIDA, M. et al. Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (*HBZ*) gene. **J Virol.**, 82:9359-9368, 2008.

ZHAO, T.; MATSUOKA, M. *HBZ* and its roles in HTLV-1 oncogenesis. **Front Microbiol.**, 3:247, 2012.

10. ANEXO

10.1. ANEXO 1: Aprovação do Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

ENVIADO POR: CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE

NO. TEL: 61 3315 2150

28 FEV. 2007 17:26 P1



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 117/2007

Registro CONEP: 13097 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE - 0121.0.054.000-06

Processo nº 25000.092293/2006-78

Projeto de Pesquisa: "Estudo da apoptose e da clonalidade como marcadores clínicos na leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL)".

Pesquisador Responsável: Dra. Achilea Cândida Lisboa Bittencourt

Instituição: Hospital Universitário Prof. Edgard Santos - UFBA

Área Temática Especial: Genética, Biossegurança e Cooperação estrangeira

Patrocinador: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Ao proceder a análise das respostas apresentadas ao Parecer CONEP 1211/2006 considerou-se que:

1. Foi atendido o item 2.1 da Res. CNS 347/2005.
2. Foi encaminhada anuência identificada das instituições participantes.
3. Foi encaminhada Folha de Rastros assinada pela pesquisadora e pelo responsável institucional.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se por aprovar o projeto.

Situação: Projeto aprovado

Brasília, 23 de fevereiro de 2007.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora Interina da CONEP/CNS/MS