

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

*FLAVIA MADEIRA MONTEIRO DE CASTRO*

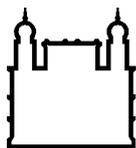
**LINFÓCITOS T INFECTADOS PELO VÍRUS HTLV-1 SECRETAM  
FATORES CAPAZES DE MODULAR GENES RELACIONADOS À  
MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS MUSCULARES  
ESQUELÉTICAS DIFERENCIADAS.**

Dissertação apresentada ao Instituto  
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Mestre em  
Biologia Celular e Molecular

**Orientadores:** Wilson Savino  
Suse Dayse Silva Barbosa

**RIO DE JANEIRO**

2011



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

*FLAVIA MADEIRA MONTEIRO DE CASTRO*

**LINFÓCITOS T INFECTADOS PELO VÍRUS HTLV-1 SECRETAM  
FATORES CAPAZES DE MODULAR GENES RELACIONADOS À  
MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS  
DIFERENCIADAS.**

**Orientadores:** Wilson Savino  
Suse Dayse Silva Barbosa

**Aprovada em:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Examinadores:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alda Maria da Cruz - **Presidente**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Bonomo

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Mermelstein

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Dumith Chequer Bou-Habbib

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Ingo Riederer

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda força que consegui encontrar dentro de mim mesma.

Aos meus pais (Flávio e Fátima), pela força e apoio de sempre.

Ao meu companheiro Alan, por me entender e me incentivar mesmo nos momentos difíceis.

Aos meus orientadores, Wilson Savino e Suse Dayse pela amizade, pela orientação, pelo aprendizado que me proporcionaram, e pela oportunidade de realizar este trabalho. Devo muito a vocês por me ajudarem a crescer, tanto na vida profissional como na vida pessoal também.

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa sobre o Timo (LPT), a todos, sem exceção, pela amizade e alegria que tenho em estar com vocês.

Às amigas, Leandra, Eliane e Daiane, que me ajudaram muito, de todas as maneiras possíveis. Ninguém faz nada sozinho, e eu só pude estar aqui com a ajuda de vocês.

Aos amigos Marcelo e Sandro, por me ajudarem com as análises estatísticas. A ajuda de vocês foi essencial para este trabalho.

Aos pesquisadores do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, Daniela Mendesda-Cruz, Indo Riederer, Juliana de Meis e Déa Villa-Verde, por colaborarem com a minha formação.

Aos integrantes do LPT, Désio, Sidnéa, Valmir e Celso por estarem sempre solícitos em ajudar.

Ao revisor deste trabalho, Dumith Chequer Bou-Habib, por ter aceitado o convite e contribuir com suas sugestões e críticas.

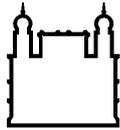
Aos membros da banca de dissertação, Alda Maria da Cruz, Adriana Bonomo, e Claudia Mermesltein por terem aceitado o convite em participar, e por contribuírem com suas críticas e sugestões.

À pós-graduação em Biologia Molecular e Celular, e toda a sua equipe; todos sempre dispostos a resolver as questões dos alunos.

Às agências de fomento, CAPES e CNPq, e ao Instituto Oswaldo Cruz pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais!  
Vocês são a minha grande inspiração.

"A sabedoria superior tolera, a inferior julga; a superior perdoa, a inferior condena. Tem coisas que o coração só fala para quem sabe escutar."  
"Ninguém pode começar de novo, mas, qualquer um pode fazer um novo fim."  
(Chico Xavier)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## LINFÓCITOS T INFECTADOS PELO VÍRUS HTLV-1 SECRETAM FATORES CAPAZES DE MODULAR GENES RELACIONADOS À MIGRAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS MUSCULARES ESQUELÉTICAS DIFERENCIADAS

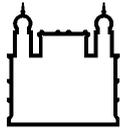
### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

#### RESUMO

O Vírus linfotrófico humano de células T (HTLV) causa a Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (TSP/HAM). A TSP/HAM é caracterizada por uma paraparesia crônica e progressiva com danos na medula espinhal. Outras doenças inflamatórias podem estar associados à TSP/HAM, como dermatite, meningite, encefalopatia, alveolite pulmonar, uveíte e miopatias. Pacientes com TSP/HAM e miopatias apresentam fraqueza muscular, atrofia e infiltrado inflamatório no tecido muscular, composto por linfócitos T CD4<sup>+</sup> infectados pelo HTLV-1 ou não infectados e células T CD8<sup>+</sup> HTLV-1 específicas. Isto sugere a participação do sistema imune no desenvolvimento desta doença. Estudos *in vitro* mostraram que células T HTLV-1<sup>+</sup> ou seu sobrenadante podem gerar danos no tecido muscular, sem que o músculo esteja infectado.

Neste contexto, nosso projeto visou determinar se ocorre modulação de expressão gênica de moléculas relacionados à migração celular em células musculares humanas após tratamento com sobrenadante concentrado de células T infectadas pelo HTLV-1, quando comparadas ao tratamento com solução salina. Observamos um aumento de expressão em cinco genes de integrinas, de dois genes que codificam cadeias de laminina, e também de três metaloproteínases, em células musculares tratadas com sobrenadante concentrado de células infectadas pelo HTLV-1. Nosso último objetivo foi confirmar a especificidade da modulação da expressão gênica causada por fatores secretados por células T infectadas pelo HTLV-1. A análise comparativa entre as células musculares tratadas com sobrenadante concentrado de célula T infectada *versus* célula T não infectada mostrou apenas um gene modulado entre esses dois grupos, o gene que codifica a proteína trombospondina-1.

Em conclusão, mostramos que linfócitos infectados pelo HTLV-1 podem secretar fatores capazes de modular a expressão de genes relacionados à migração celular, como os genes de integrinas, moléculas de adesão, moléculas de matriz extracelular e metaloproteínases em células musculares esqueléticas. Considerando que dados semelhantes foram observados com sobrenadantes de linfócitos T ativados de linhagem Jurkat (não infectada por HTLV-1), é provável que fatores secretados pelos linfócitos infectados por HTLV-1 decorram de seu estado de ativação.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **SECRETED FACTORS FROM HTLV-1-INFECTED T LIMPHOCYTES ARE CAPABLE TO MODULATE MIGRATION-RELATED GENES IN DIFFERENTIATED SKELETAL MUSCLE CELLS**

### **MASTER DISSERTATION ABSTRACT**

The human T cell lymphotropic virus (HTLV) can cause HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). HAM/TSP is characterized by a chronic and progressive paraparesis with spinal cord damage. Other diseases can be associated with HAM/TSP, such as dermatitis, meningitis, encephalopathy, pulmonary alveolitis, uveitis, and myopathies. HAM/TSP patients with myopathies present muscle weakness, atrophy and inflammatory infiltrate in muscle tissue, composed by infected and uninfected CD4+ T lymphocytes and HTLV-1 specific CD8+ T cells. These findings suggest the participation of the immune system during disease development. *In vitro* studies showed that HTLV-1-infected cells or their culture supernatants can generate muscle damage, even without muscle infection.

In this context, our project aims to determine whether cellular migration-related genes are modulated in human muscle cells treated with culture supernatant from HTLV-1 infected T cells, or exposed only to phosphate buffered saline.

We observed increased expression of five integrin, two laminin chain and three matrix metalloproteinases genes in muscle cells treated with supernatants from HTLV-1-infected cells.

An additional goal was to confirm the specificity of gene expression modulation caused by soluble factors released by HTLV-1-infected cells. Thus, we analyzed modulation of gene expression in muscle cells treated with supernatants from either T cells infected or not by HTLV-1. In these assays, we found alteration only in the thrombospondin-1 gene, which was down-regulated.

In conclusion, we showed that HTLV-1-infected lymphocytes can secrete factors that are capable to modulate migration-related genes, such as genes of integrins, adhesion molecules, extracellular matrix molecules and matrix metalloproteinases in skeletal muscle cells. Considering that similar data were also observed with supernatant from an activated T lymphocyte lineage not infected by HTLV-1 (Jurkat cells), it is possible that secreted factors from HTLV-1 infected lymphocytes are related to its activation state.

# ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>13</b>
1.1. HTLV: aspectos epidemiológicos.....	13
1.2. Vias de transmissão do HTLV .....	15
1.3. Mecanismos de infecção e regulação do HTLV.....	16
1.4 Doenças associadas ao HTLV-1 .....	19
1.4.1. Leucemia/linfoma da célula T do adulto – ATL.....	19
1.4.2. Paraparesia espástica tropical/Mielopatia associada ao HTLV.....	20
1.4.2.1. Papel da proteína viral Tax durante a TSP/HAM.....	24
1.5. Miopatias associadas ao HTLV-1 .....	25
<b>2. Justificativa e Objetivo Geral.....</b>	<b>28</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>29</b>
3.1. Cultivos celulares.....	29
3.2 Ensaio de adesão entre linfócitos T infectados com HTLV-1 e mioblastos diferenciados .....	29
3.3. Ensaio de cultivo de miotubos com sobrenadante de linfócitos T infectados pelo HTLV-1 .....	30
3.4. Extração de RNA total .....	30
3.5. Reação polimerase em cadeia com transcriptase reversa em tempo real...	31
3.6. Análise de expressão gênica .....	35
3.7. Análises citofluorimétricas e de imunohistoquímica.....	35
<b>4. Resultados .....</b>	<b>37</b>
4.1. Caracterização fenotípica dos cultivos de mioblastos humanos.....	37
4.2. Expressão de proteínas virais na linhagem de linfócitos HTLV-1 <sup>+</sup> .....	39

4.3 Co-cultivo de células musculares diferenciadas e linfócitos T HTLV-1 <sup>+</sup> .....	40
4.4. Linfócitos T HTLV-1 <sup>+</sup> secretam fatores capazes de modular genes relacionados à migração celular em células musculares diferenciadas .....	41
<b>5. Discussão.....</b>	<b>49</b>
<b>6. Conclusões E Perspectivas Futuras .....</b>	<b>56</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>57</b>
<b><u>Anexos</u> .....</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

1.1: Distribuição de casos HTLV-1 na população mundial.....	14
1.2. Esquema do genoma do HTLV.....	17
1.3. Esquema representando a barreira hemato-encefálica. ....	22
1.4. Amostra de tecido muscular esquelético exibindo infiltrado inflamatório perimisial e atrofia de fibras.....	26
4.1. Caracterização da cultura de célula muscular esquelética antes e após diferenciação in vitro. ....	38
4.2. Caracterização da linhagem de células T infectadas com HTLV-1. ....	39
4.3. Co-cultivo de células musculares diferenciadas com as células T HTLV-1+..	41
4.4. Fotografia representativa do gel de RNA desnaturante de amostras utilizadas na RT-PCR.....	42
4.5. Fatores solúveis da células T infectadas modulam a expressão gênica de integrinas em células musculares humanas diferenciadas. ....	43
4.6. Fatores solúveis da célula T infectada modulam a expressão gênica de moléculas de matriz extracelular em células musculares humanas diferenciadas. ....	44
4.7. Fatores solúveis da célula T infectada modulam a expressão gênica de moléculas de adesão celular em células musculares humanas diferenciadas.....	46
4.8. Fatores solúveis de células T infectadas modulam a expressão gênica de metaloproteinases de matriz em células musculares humanas diferenciadas. ....	47
4.9. Modulação negativa do gene de trombospondina-1 por fatores solúveis da célula HTLV-1+ em células musculares humanas diferenciadas.....	48
5.1. Modulação gênica em células musculares diferenciadas, após contato com fatores solúveis produzidos por linfócitos infectados pelo vírus HTLV-1: possibilidade de tais genes favorecerem a entrada de novas células inflamatórias.....	53

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 3.1: Lista de genes e controles presentes na placa de microarranjo para PCR.....</b>	<b>32</b>
--	-----------

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AP-1: Proteína ativadora-1

DNA: Ácido desoxirribonucleico

ECM: Matriz extracelular

GLUT-1: Molécula transportadora de glucose-1

GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

HLA: Antígeno leucocitário humano

HTLV-1: Vírus linfotrópico humano de células T tipo 1

IL: Interleucina

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular-1

IFN: Interferon

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

MMP: metaloproteinase de matriz

NFκB: Fator nuclear κB

NCAM: Molécula de adesão neuronal

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas

SNC: Sistema Nervoso Central

TGF: Fator de crescimento tumoral

TNF: Fator de necrose tumoral

TSP/HAM: paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1

VCAM-I: Molécula de adesão celular vascular -1

VLA: Antígeno de aparecimento tardio

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. HTLV: aspectos epidemiológicos

O Vírus linfotrófico humano de células T (HTLV) é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae* e gênero *Deltaretrovirus* (Ohtsuki *et al.*, 1982). Descrito por Poiesz e colaboradores em 1980, foi o primeiro retrovírus humano a ser descoberto (Poiesz *et al.*, 1980). A classificação em vírus HTLV do tipo 1 (HTLV-1) ocorreu em 1982, sendo em seguida descrito o vírus tipo 2 (HTLV-2), que apresenta aproximadamente 70% de similaridade em sua sequência nucleotídica com o tipo 1 (Kalyanaraman *et al.*, 1982, Manns & Blattner 1991). Recentemente foram descritos mais dois vírus relacionados, classificados como HTLV tipo 3 e tipo 4 (HTLV-3 e HTLV-4), ambos isolados na região da África Central (Calattini *et al.*, 2005; Mahieux & Gessain 2009). O vírus HTLV-1 é mais encontrado em pacientes que apresentam patologias associadas ao vírus, enquanto que tal associação não foi determinada de maneira definitiva para o HTLV-2 (Lehky *et al.*, 1996)

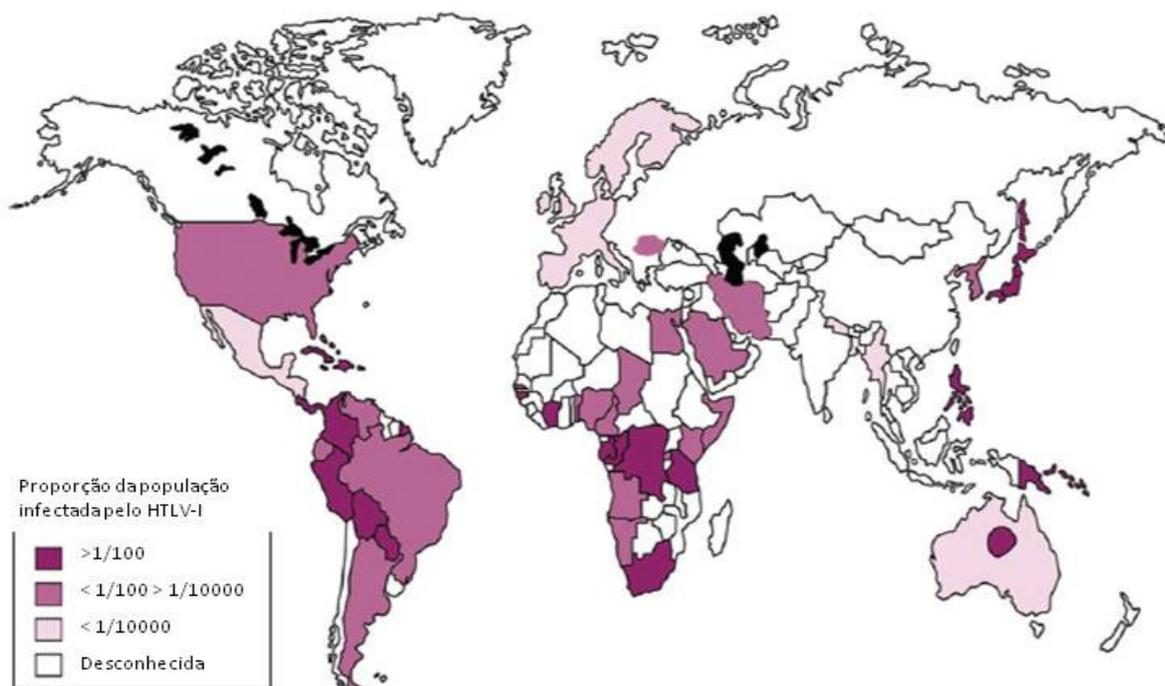
Especificamente em relação ao HTLV-1, são descritos 4 subtipos com características genéticas distintas: africano, cosmopolita, japonês e nelanesiano (Slattery *et al.*, 1999). No entanto, segundo Ehrlich e colaboradores, não há correlação estabelecida entre patogenicidade e esses subtipos virais (Ehrlich *et al.*, 1992). No Brasil, o subtipo cosmopolita é o mais predominantemente encontrado em pacientes infectados pelo HTLV-1 (Yamashita *et al.*, 1999).

Embora haja poucos estudos de prevalência da infecção pelo HTLV no mundo, acredita-se que em torno de 15 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas, sendo a maioria delas oriundas de regiões endêmicas, como o sul do Japão, África sub-saariana, Bacia do Caribe, América Latina e países do Oriente Médio, como o Irã (Proietti *et al.*, 2005). Nestas regiões, os índices de indivíduos soropositivos para o HTLV-1 são muito elevados: no sul do Japão foi observada uma prevalência acima de 10% (Morofuji-Hirata *et al.*, 1993). Já em países da Bacia do Caribe foi descrito um índice de 6%, e nos países da África Sub-Saariana esse índice é de 5% (Proietti *et al.*, 2005).

Por outro lado, em países da Europa, a soro-prevalência é baixa, em torno de 0,1%, mas índices mais altos são observados dentro das populações de imigrantes (Ades *et al.*, 2000). Um estudo recente realizado com doadores de sangue na Turquia revelou um índice muito baixo na prevalência da infecção por HTLV-1 e HTLV-2, tanto

que nessa região foi questionada a importância da sorotipagem dos doadores (Sertoz *et al.*, 2010). A Figura 1.1 ilustra a frequência deste vírus em diversas regiões do mundo.

No Brasil, estudo realizado em doadores de sangue mostrou alta prevalência dos vírus HTLV-1 e HTLV-2 nos estados do Pará, Bahia, Maranhão, Amapá e Pernambuco, com índices de 7,5 a 10 infectados para cada 1000 habitantes. Já os estados de Santa Catarina e Rondônia apresentaram prevalência abaixo de 1/1000 habitantes (Catalan-Soares *et al.*, 2005).



**Figura 1.1: Distribuição de casos HTLV-1 na população mundial.** Adaptado de Cooper *et al.*, 2009.

A heterogeneidade dos índices de infecção pelo HTLV pode ser observada praticamente em todo o mundo, e isso ocorre inclusive dentro da população de um mesmo país, como são os casos de Brasil e Japão. Mesmo hoje, pouco se sabe sobre o porquê de algumas populações apresentarem altos índices de prevalência, enquanto outras não (Cooper *et al.*, 2009). Um dos motivos pode ser inerente aos próprios estudos já realizados, pois poucos trabalhos apresentam análises mais abrangentes de população. A maioria das análises epidemiológicas tem sido realizada utilizando grupos selecionados, tais como, doadores de sangue, gestantes, habitantes de pequenas regiões, etc. Neste sentido, o rastreamento realizado em pequenos grupos

selecionados é pouco representativo, gerando um resultado subestimado para os números de infectados pelo vírus HTLV (Cooper *et al.*, 2009).

## 1.2. Vias de transmissão do HTLV

A transmissão do HTLV-1 pode ocorrer de diferentes maneiras: transmissão horizontal através de transfusão de sangue e compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas; via sexual, com maior possibilidade de transmissão do homem para mulher; transmissão vertical durante o aleitamento materno prolongado (Manns *et al.*, 1999). O HTLV pode ser transmitido pelas mesmas vias de transmissão que o vírus da imunodeficiência humana (HIV), sendo, no entanto considerado menos infectante que o HIV (Mazurov *et al.*, 2010).

As estratégias de transmissão utilizadas pelo HTLV não estão completamente elucidadas, e a ocorrência de um longo período de latência do vírus durante a infecção dificulta estes estudos. Sabe-se que, ao contrário do HIV, o HTLV-1 existe predominantemente como um provírus associado às células infectadas (Tachibana *et al.*, 1992).

O HTLV-1 possui tropismo por linfócitos T, principalmente células T CD4<sup>+</sup>, podendo, no entanto, infectar células T CD8<sup>+</sup>, células dendríticas, macrófagos, monócitos e células-tronco hematopoiéticas na medula óssea (Hanon *et al.*, 2000, Koyanagi *et al.*, 1993, Macatonia *et al.*, 1992). Células da medula óssea infectadas podem funcionar como um potencial reservatório do vírus durante a infecção, devido à expansão clonal das células com o provírus (Banerjee *et al.*, 2008).

Além de células do sistema imune, o HTLV pode infectar astrócitos e microglia, isto é, células do sistema nervoso central (Grant *et al.*, 2002).

As células T naturalmente infectadas pelo HTLV geralmente não secretam o vírus, sendo a carga viral indetectável no soro de pacientes (Majorovits *et al.*, 2008). Presume-se que durante os estágios iniciais da infecção, a maioria das novas infecções celulares decorra da infecção por contacto célula-célula, que ocorre a partir de interações inespecíficas entre linfócitos T, resultando em uma infecção policlonal. Em estágios tardios, quando o equilíbrio entre a replicação viral e a resposta imune é alcançado, o HTLV-1 multiplica-se principalmente por expansão clonal dependente da mitose da célula hospedeira infectada (Verdonck *et al.*, 2007).

Essa passagem do vírus por contato célula-célula é mediada pela formação de uma sinapse virológica, que consiste no estabelecimento de uma região de interação

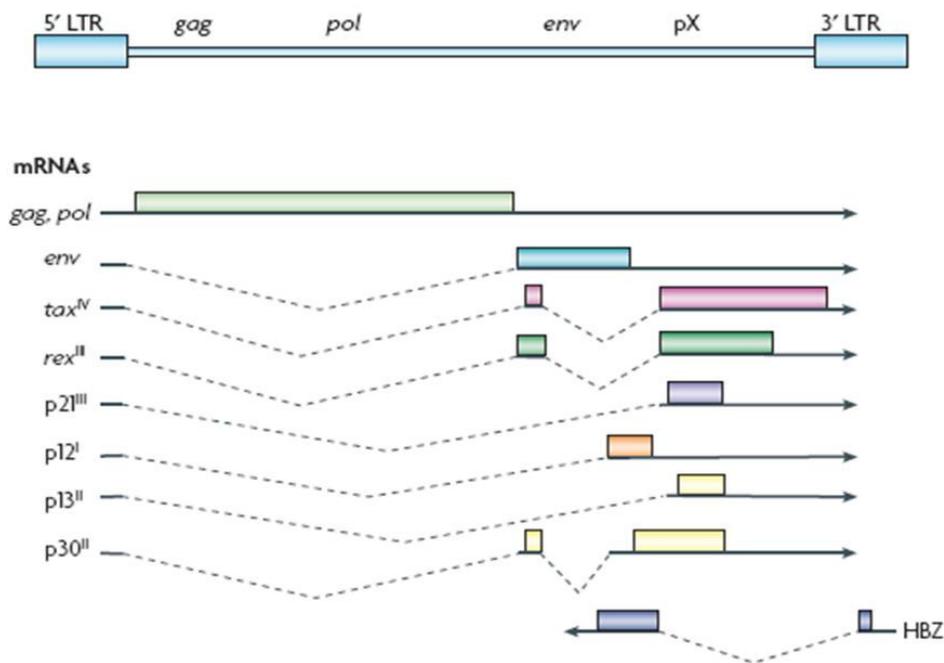
entre a célula infectada e a célula-alvo, com polarização de microtúbulos e participação de moléculas virais como a Tax, e de moléculas do hospedeiro que medeiam a interação célula-célula, como a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e o antígeno associado à função leucocitária (LFA-1). As partículas virais são direcionadas para a sinapse através da orientação dos microtúbulos (Nejmeddine *et al.*, 2005).

Como já mencionado, a disseminação do HTLV-1 ocorre basicamente através do contato celular, pois o vírus livre é pouco infeccioso (Bangham 2003), embora existam dados demonstrando que partículas virais livres podem infectar células dendríticas, e que estas podem transmitir o vírus para linfócitos T (Jones *et al.*, 2008). Este mecanismo pode ser relevante para a disseminação do vírus durante a fase inicial da infecção, pois quando o vírus atinge o organismo através de mucosas (local onde células dendríticas possuem um papel fundamental na captação de antígenos) sua incorporação em células-alvo ocorre de maneira mais rápida e eficiente (Jones *et al.*, 2008).

### **1.3. Mecanismos de infecção e regulação do HTLV**

O HTLV é um vírus envelopado e seu genoma é composto de duas fitas simples de RNA de polaridade positiva, ou seja, um retrovírus com capacidade de produzir a enzima transcriptase reversa e promover a transcrição do genoma de RNA em fita de DNA complementar (Verdonck *et al.*, 2007). O genoma viral é composto de vários genes conforme ilustrado na Figura 1.2.

O ciclo replicativo viral é iniciado com a ligação de glicoproteínas de superfície do envelope do HTLV-1, como gp46 (porção de superfície) acoplada à gp21 (porção transmembranar), e a moléculas específicas presentes na membrana das células do hospedeiro. O primeiro receptor descrito para o HTLV-1 foi a molécula transportadora de glicose-1, Glut-1 (Manel *et al.*, 2003). Recentemente outras moléculas, como a proteoglicana heparano sulfato (HSPG) e a neuropilina-1 também foram descritas como receptores, mediadores da entrada do HTLV-1 na célula (Lambert *et al.*, 2009).



**Figura 1.2. Esquema do genoma do HTLV.** As regiões LTR compõem as extremidades do genoma viral, a região *gag* codifica proteínas estruturais enquanto que *env* codifica proteínas do envelope viral, a região *pol* codifica as enzimas, protease, integrase e transcriptase reversa, a região *px* codifica proteínas regulatórias p12, p13, p21 e p30, além das proteínas Tax e Rex. A proteína HBZ é codificada a partir de *splicing* do RNA oriundo de parte da região *px* e parte da região LTR. Adaptado de Verdonck *et al.*, 2007.

Após a ligação entre as glicoproteínas de superfície do envelope viral com os receptores da célula hospedeira, ocorre a penetração do nucleocapsídeo no interior da célula e a transcrição do genoma viral de RNA fita simples para DNA de fita dupla, pela transcriptase reversa. Em seguida, há a integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira, através da ação da enzima viral integrase. Nesta fase o vírus é chamado de provirus (Verdonck *et al.*, 2007).

Após a integração do vírus no genoma da célula hospedeira ocorre ativação da transcrição do genoma viral, com a participação de proteínas virais acessórias e da maquinaria celular hospedeira. A região genômica *pX* do HTLV-1 codifica as proteínas acessórias p12I, p27I, p13II e p30II, através de diferentes formas de *splicing* alternativo do RNA mensageiro, que inclui dois segmentos de fase de leitura aberta (ORF I e ORF II). As proteínas virais acessórias p12 e p30 atuam na regulação da expressão gênica,

através da ativação de fatores de transcrição, e estão relacionadas com a manutenção da carga proviral durante a infecção (Bartoe *et al.*, 2000, Ding *et al.*, 2002), e com alterações do ciclo celular (Datta *et al.*, 2007).

As proteínas não estruturais Tax e Rex também são codificadas a partir da região pX do HTLV-1. A proteína Tax induz a transcrição do genoma proviral através da interação com fatores de transcrição que se ligam às regiões terminais não codificantes do provírus (LTRs). Tax é uma fosfoproteína de localização nuclear que, além de promover a transcrição de genes virais, pode induzir a expressão de genes da célula hospedeira (Wano *et al.*, 1988). Esta proteína é capaz de promover a expressão gênica dos proto-oncogenes *c-fos*, *myc* e *egr* (Nagata *et al.*, 1989; Duyao *et al.*, 1992); e de fatores de crescimento celular, tais como: o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Trejo *et al.*, 1997), o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (Nimer *et al.*, 1989) e o fator de crescimento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Kim *et al.*, 1990). Além disso, a proteína Tax está envolvida na indução de expressão das citocinas, interleucina-1, interleucina-2, interleucina-3 e interleucina-6, além da cadeia  $\alpha$  do receptor de interleucina-2 (IL-2R $\alpha$ ) (Franchini, 1995); moléculas de adesão, como ICAM-1 (Tanaka *et al.*, 1996) e na ativação de fatores de transcrição, como NF- $\kappa$ B (fator nuclear  $\kappa$ B), a proteína CREB (*cAMP response element-binding protein*) e AP-1 (*activator protein-1*) (Yoshida, 2001).

Outra proteína do HTLV-1, conhecida como HBZ (*basic leucine zipper factor*), codificada a partir de *splicing* RNA mensageiro antisenso transcrito da região 3' LTR e parte da região px, como mostrado na Figura 1.2 (Satou *et al.*, 2006), é comumente expressa em células leucêmicas de pacientes infectados que não expressam Tax, isto é 60% dos casos (Takeda *et al.*, 2004). Existe uma coordenação na expressão das proteínas Tax e HBZ, isto é, Tax ativa a expressão de HBZ, que por sua vez, reprime a expressão de Tax (Satou *et al.*, 2006). Este evento contribui para o escape de células infectadas da ação do sistema imune devido à ineficiência da resposta citotóxica específica para HBZ, e pelo fato de Tax induzir uma forte resposta citotóxica. Logo, ao promover a repressão de Tax, HBZ contribui para a persistência do HTLV-1 e para a manutenção do reservatório viral durante a infecção (Suemori *et al.*, 2009).

Diferentemente de Tax, a proteína Rex age como regulador pós-transcricional do HTLV-1, atuando no processamento e transporte de moléculas de RNA mensageiro viral. Desta maneira, Rex pode induzir o acúmulo de proteínas estruturais, em detrimento de proteínas acessórias, favorecendo a produção de vírus. Ou seja, no início da infecção a quantidade de Rex ainda é insuficiente, mas à medida que há

acúmulo de Rex, ocorre a mudança da fase de produção viral. Assim, Rex funciona como um regulador positivo, que controla a transição da fase inicial, fase latente e fase tardia da produção de partículas virais (Younis & Green, 2005).

#### **1.4 Doenças associadas ao HTLV-1**

As principais doenças associadas à infecção pelo HTLV-1 são a Leucemia da célula T do adulto, conhecida como ATL, e a Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV, ou TSP/HAM. Os riscos de desenvolvimento destas patologias variam de índices de 2,5% a 5% para ATL (Yamaguchi & Watanabe 2002; Murphy *et al.*, 1989) e de 0,3% a 2% para TSP/HAM dentre os indivíduos infectados pelo HTLV-1. Entretanto, este percentual pode mudar nas diferentes populações (Maloney *et al.*, 1998; Kaplan *et al.*, 1990).

A relação entre a infecção viral e o desenvolvimento de uma doença em detrimento da outra continua a ser investigada, apesar de alguns autores afirmarem que o desfecho clínico pode estar relacionado com a via de infecção do paciente (Grant *et al.*, 2002).

Em geral, as patologias relacionadas ao HTLV-1 ocorrem após 20 a 30 anos de latência viral. No entanto, casos de dermatite infecciosa podem ocorrer em pacientes durante a infância e adolescência (Primo *et al.*, 2009). Além disso, há relatos de lesões dermatológicas encontradas durante triagem de doadores de sangue HTLV-1 positivo (Goncalves *et al.*, 2003).

A grande maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanece sem manifestações clínicas claras durante toda a vida, sendo classificados como carreadores assintomáticos. Este grupo representa um grande risco para saúde pública, já que muitos desses indivíduos desconhecem sua condição, o que gera ainda um problema na determinação real da disseminação do HTLV-1 no mundo.

##### **1.4.1. Leucemia/linfoma da célula T do adulto – ATL**

A leucemia/linfoma da célula T do adulto é uma doença linfoproliferativa que acomete linfócitos T periféricos de adultos com pelo menos 20 a 30 anos de infecção pelo HTLV-1, e que apresenta alta agressividade (Yoshida *et al.*, 1982). Foi descrita inicialmente em 1977 no Japão, e mais tarde no Caribe e América do Sul (Blattner *et al.*, 1982, Blayney *et al.*, 1983; Uchiyama *et al.*, 1977).

O período de sobrevivência a partir do diagnóstico varia de 4 a 6 meses para ATL tipo aguda, de 9 a 10 meses para o tipo linfomatoso, de 17 a 24 meses para o tipo crônico, e de 34 meses a 5 anos para o tipo latente (Shimoyama 1991). O diagnóstico requer a detecção no sangue de células ATL, ou *flower cells*, que se caracterizam pelo núcleo de cromatina condensada. O diagnóstico também acompanha a imunofenotipagem de linfócitos periféricos, e de biópsia de linfonodos nos casos de linfadenopatia. Além disso, podem ser observadas lesões de pele, fígado, baço, pulmões, trato gastrointestinal, medula óssea, ossos e sistema nervoso central (Tsukasaki *et al.*, 2009).

Os mecanismos pelos quais o HTLV-1 desencadeia a ATL ainda não foram completamente elucidados. No entanto, sabe-se que a proteína Tax exerce um papel fundamental no processo de transformação maligna das células infectadas, pois ela é capaz de induzir ativação de linfócitos T, induzir ou inibir apoptose celular, promover acúmulo de dano no DNA, além de interferir com a função das proteínas do ciclo celular (Chlichlia & Khazaie, 2010). Desta maneira, a proteína Tax está relacionada à indução de aneuploidia e instabilidade genômica das células T infectadas, o que aumenta a possibilidade do surgimento de células neoplásicas, contribuindo para o desenvolvimento da ATL em pacientes HTLV-1-positivos (Marriott & Semmes, 2005). Além disso, camundongos transgênicos que expressam Tax desenvolvem doença linfoproliferativa (Grossman *et al.*, 1995).

#### **1.4.2. Paraparesia espástica tropical/Mielopatia associada ao HTLV**

A TSP/HAM é a doença neurológica mais comumente associada à infecção pelo HTLV-1. Apresenta progressão crônica e decorre da desmielinização da medula espinhal com degeneração neuronal, e resulta em um quadro clínico de paraparesia espástica lenta e progressiva de membros inferiores, além de outros sintomas, como distúrbios urinários e sexuais, dor lombar, e leve perda sensorial de membros inferiores (Nakagawa *et al.*, 1995). Essa doença progride mais rapidamente em mulheres que em homens. Ainda que a razão para tal diferença seja desconhecida, existem relatos de que hormônios sexuais possam estar envolvidos (Lima *et al.*, 2005).

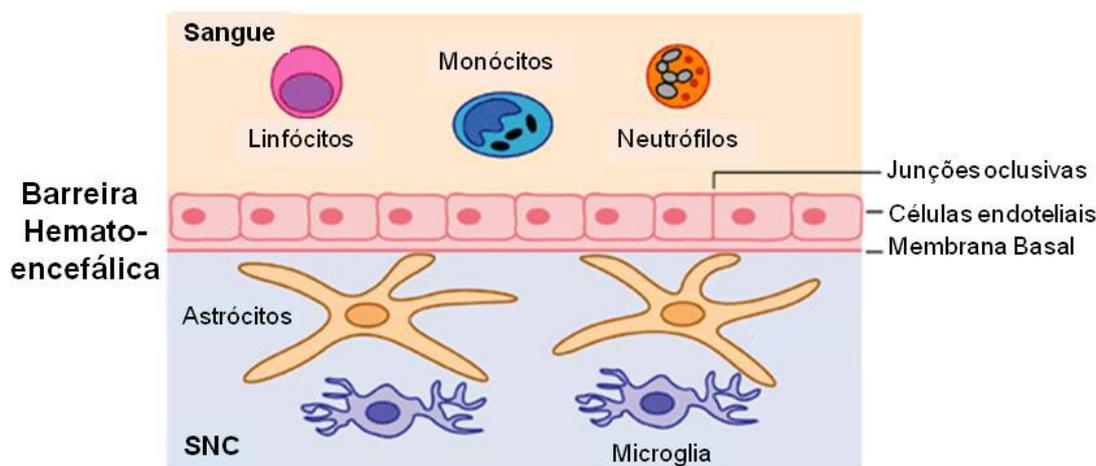
O risco de desenvolvimento da TSP/HAM em portadores assintomáticos varia de 0,25% a 4% entre diferentes grupos étnicos. A doença ocorre mais frequentemente em áreas endêmicas, com casos esporádicos em regiões não endêmicas (Nakagawa *et al.*, 1995; Hisada *et al.*, 2004).

Dentre os fatores de risco para TSP/HAM incluem-se fatores genéticos que conferem predisposição ou resistência ao desenvolvimento da doença nos indivíduos infectados. Estudos de polimorfismo gênico sugerem que a presença do alelo - 863A do gene *TNF- $\alpha$* , e mutações no promotor do gene *MMP-9*, estão associadas a um aumento de risco de adquirir TSP/HAM entre indivíduos infectados. Por outro lado, indivíduos que apresentam o alelo -592A para o gene *IL-10* possuem certa proteção ao desenvolvimento da TSP/HAM (Kodama *et al.*, 2004; Vine *et al.*, 2002). Segundo os autores, o polimorfismo gênico estaria associado à capacidade da proteína viral Tax de promover a ativação dos genes *IL-10* e *MMP-9* e esta habilidade estaria sendo prejudicada ou aumentada em indivíduos que possuem determinados alelos, gerando alterações da resposta imune no sítio de inflamação.

Além disso, há indícios de associação entre o padrão de HLA de certas populações e o risco de desenvolvimento da TSP/HAM. Por exemplo, foi demonstrado que a presença do alelo HLA-A\*02 confere proteção, enquanto que o alelo DRB1\*0101 confere susceptibilidade a este tipo de patologia (Jeffery *et al.*, 1999). No entanto, este tipo de associação pode variar de acordo com a população de estudo, por apresentarem variações na composição dos alelos HLA (Jeffery *et al.*, 2000).

O perfil de pacientes TSP/HAM é caracterizado pela alta carga proviral que estes indivíduos apresentam, quando comparados com pacientes HTLV-1 positivos assintomáticos (Gessain *et al.*, 1990), havendo assim uma correlação positiva entre a carga proviral e o risco de desenvolver TSP/HAM (Primo *et al.*, 2009).

Outro evento importante durante a TSP/HAM é a ruptura da barreira hematoencefálica destes pacientes. Foi demonstrado que a presença de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- $\alpha$ , secretadas por linfócitos infectados, induzem a ruptura das junções oclusivas presentes no endotélio, resultando em alterações de permeabilidade da barreira hematoencefálica (Afonso *et al.*, 2007). Este evento favorece ainda mais a passagem de linfócitos para o Sistema Nervoso Central (SNC). A seguir o esquema mostra a composição da barreira hematoencefálica Figura 1.3.



**Figura 1.3. Esquema representando a barreira hemato-encefálica.** No sangue periférico se encontram as células do sistema imune que podem atravessar a barreira hemato-encefálica, composta por células endoteliais unidas por junções oclusivas e membrana basal. Dentre as células do SNC, próximo à barreira localizam-se os astrócitos circundados por células da microglia. Adaptado de Francis *et al.*, 2003.

Para melhor compreender as hipóteses de desenvolvimento de lesões no SNC é importante ressaltar a composição celular da medula espinhal, células que exercem papel fundamental na fisiopatologia da TSP/HAM. O SNC é composto por neurônios e células gliais, estas são subdivididas em macroglia – oligodendrócitos e astrócitos -- e microglia – macrófagos do SNC. Durante a infecção pelo HTLV-1 populações de células residentes no SNC têm-se mostrado suscetíveis. Sabe-se que a perda celular que ocorre na medula espinhal durante a TSP/HAM está relacionada à ativação de células da microglia e astrócitos, à presença de infiltrado inflamatório composto de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> específicos para o vírus e à produção de citocinas inflamatórias, eventos estes que aumentam o fluxo de células da periferia para o SNC e que contribuem para o dano tecidual local e consequente persistência da resposta inflamatória no SNC (Grant *et al.*, 2002).

Diversos mecanismos não excludentes podem estar envolvidos na desmielinização e indução de morte celular no SNC, que ocorrem na medula espinhal de pacientes acometidos por TSP/HAM. Dentre eles, podem ser citados: mecanismo direto de dano tecidual, lesão causada por linfócitos *bystander*, e ainda reação autoimune envolvendo mimetismo molecular (Osame, 2002). O dano tecidual direto ocorre quando células T citotóxicas específicas para proteína viral Tax atravessam a barreira hemato-encefálica, e causam lise direta das células do SNC. A ativação

persistente destas células T citotóxicas indica presença de antígenos virais no SNC de maneira contínua (Parker *et al.*, 1992). O mecanismo *bystander* envolve dano tecidual no SNC provocado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias; neste caso, a lesão não está relacionada com resposta imune antígeno-específica contra células do SNC. A lesão ocorre, então, pela presença de células inflamatórias no local da lesão (Ijichi *et al.*, 1993, Selmaj *et al.*, 1991). Por último, o dano provocado por mecanismo autoimune acontece através da ação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> específicos para antígenos virais similares a antígenos próprios, que são comumente expressos por células do SNC. Neste caso, a resposta imune seria deflagrada por mimetismo molecular, uma resposta contra antígenos do HTLV-1 resultam em reação cruzada contra antígenos do hospedeiro, resultando em dano de células que compõem o SNC. Como exemplo, há a reação cruzada contra a molécula neuronal proteína heterogênea ribonuclear A1 (hnRNP-A1), gerada pela reação contra a proteína viral Tax (Levin *et al.*, 2002).

Durante a infecção pelo HTLV-1 são detectados anticorpos contra moléculas virais em todos os pacientes infectados, inclusive em carreadores assintomáticos. No entanto, pacientes TSP/HAM apresentam títulos maiores de anticorpos anti-HTLV-1 do que indivíduos assintomáticos (Shinzato *et al.*, 1993). Em relação aos epítomos mais reconhecidos por anticorpos anti-HTLV, detectou-se que anticorpos contra as proteínas do envelope viral aparecem em títulos similares entre os três grupos de indivíduos HTLV-1-positivos (carreadores, ATL e TSP/HAM). Porém, os títulos de anticorpos contra a proteína Tax são maiores em pacientes com TSP/HAM que nos outros grupos de pacientes infectados (Lal *et al.*, 1994).

Foi também verificado que a frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos é maior em pacientes TSP/HAM do que em indivíduos assintomáticos (Nagai *et al.*, 2001), e que estas células possuem potencial para produção de citocinas pro-inflamatórias (Kubota *et al.*, 1998), estando envolvidas com o processo de eliminação de células infectadas. Contudo, ainda não se sabe ao certo o papel dos linfócitos T citotóxicos nesta patologia. Estudo recente sugere que pacientes TSP/HAM apresentam alta frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos para o HTLV-1, porém com baixa capacidade lítica, enquanto que carreadores possuem uma frequência menor de linfócitos citotóxicos com alta capacidade lítica (Sabouri *et al.*, 2008). Estes dados sugerem que a alta frequência de tais linfócitos T CD8<sup>+</sup> anti-HTLV-1 em pacientes com TSP/HAM contribuem para o processo inflamatório de desmielinização da medula espinhal, e conseqüentemente com o agravamento do quadro clínico. A hipótese é que a presença de uma grande quantidade de células citotóxicas, produtoras de citocinas

pró-inflamatórias e com capacidade reduzida de eliminar as células infectadas, favoreça o aumento da carga proviral nestes indivíduos (Sabouri *et al.*, 2008).

Além do comprometimento linfocitário, foram isoladas células dendríticas infectadas de pacientes TSP/HAM (Macatonia *et al.*, 1992). Viu-se ainda que a proteína Tax é capaz de induzir ativação e maturação rápida dessas células, e que tal fato estaria associado ao desenvolvimento da doença, tendo em vista que contribuiria para a estimulação e manutenção de células T CD8<sup>+</sup> específicas para Tax, favorecendo ao acúmulo destas células em indivíduos infectados (Manuel *et al.*, 2009). Além disso, recentemente foi descrito que, células dendríticas podem ser infectadas por vírus livre, sendo em seguida capazes de transmiti-lo para linfócitos não infectados, favorecendo, assim, a disseminação da infecção (Jones *et al.*, 2008). Estes dados mostram que as células dendríticas também possuem um papel relevante na fisiopatologia da TSP/HAM.

Em conjunto, os dados resumidos acima sugerem que interações entre o vírus e o sistema imune do hospedeiro desempenhem papel importante na fisiopatologia da TSP/HAM. A resposta citotóxica ineficiente contra o HTLV-1 permite o aumento da carga viral e da expressão de antígenos virais em pacientes infectados, o que resulta em intensa ativação de resposta antígeno-específica, e em forte indução da produção de citocinas e quimiocinas, favorecendo, em última análise, o desencadeamento e progressão da TSP/HAM.

#### **1.4.2.1. Papel da proteína viral Tax durante a TSP/HAM**

A proteína Tax do HTLV-1 tem peso molecular de 42 kDa, pode formar dímeros. Possui uma porção de localização nuclear e uma porção de exportação nuclear, o que permite a sua localização tanto no núcleo como no citoplasma (Alefantis *et al.*, 2003; Smith & Greene, 1992). A principal função da proteína Tax é induzir a transcrição do genoma viral. Sua capacidade de regular diferentes mecanismos celulares deve-se à propriedade de interagir com vários fatores celulares, através de interações proteína-proteína. Por isso, a proteína Tax parece ter papel-chave no desenvolvimento de doenças associadas à infecção pelo HTLV-1, já que se associa, direta ou indiretamente, com diversas proteínas celulares, como fatores de transcrição, proteínas do ciclo celular, e proteínas codificadas por genes supressores de tumor (Suzuki & Yoshida, 1997), enzimas envolvidas no condensamento de cromatina (Lu *et al.*, 2004), proteínas de sinalização celular (Lee *et al.*, 2002), e ainda proteínas envolvidas com

vias secretórias, como porinas nucleares (Alefantis *et al.*, 2005). Com todas essas possibilidades de interações, a proteína Tax pode interferir em processos fundamentais para célula hospedeira, tais como, expressão gênica, ativação celular, proliferação e sobrevivência. Além disso, Tax pode ser encontrada no meio extracelular, sendo liberada como decorrência de apoptose celular e, ainda, por vias secretórias a partir de células infectadas (Boxus *et al.*, 2008).

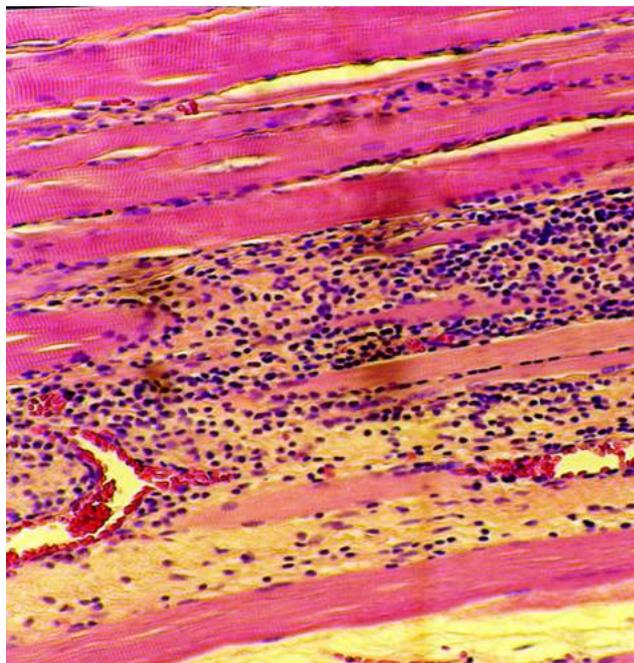
Estudos mostram que Tax contribui para a forte ativação da resposta imune que ocorre durante a TSP/HAM, seja pela indução de uma resposta inflamatória exacerbada e ineficiente na eliminação do vírus, ou por induzir citocinas pró-inflamatórias em células infectadas, como a produção de TNF- $\alpha$  em linhagem de células neuronais humanas (Cowan *et al.*, 1997). Além disso, efeitos patológicos observados em pacientes TSP/HAM, como desmielinização do SNC, talvez sejam um efeito direto de tax (Selmaj&Raine 1988). Foi observado que células da microglia produzem TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, e macrófagos primários de sangue periférico secretam TNF- $\alpha$ , em resposta a Tax (Dhib-Jalbut *et al.*, 1994). Estes dados sugerem fortemente um envolvimento de Tax não só na indução da produção de citocinas pró-inflamatórias, mas também na perda tecidual que ocorre no SNC durante o desenvolvimento da TSP/HAM.

### **1.5. Miopatias associadas ao HTLV-1**

Pacientes HTLV-1-positivos podem desenvolver doenças musculares, dentre elas a miopatia inflamatória idiopática, a polimiosite (Gilbert *et al.*, 2001), a dermatomiosite (de Oliveira Mde *et al.*, 2004) e a miosite esporádica com corpos de inclusão (Matsuura *et al.*, 2008).

As miopatias são caracterizadas por atrofia de fibras musculares, e pela presença de infiltrado inflamatório composto de linfócitos e macrófagos. No entanto, os mecanismos pelos quais o vírus desencadeia o surgimento dessas patologias continuam desconhecidos. A associação entre polimiosite e a infecção por HTLV-1 tem sido relatada na literatura. Um estudo realizado na Jamaica mostrou que a maioria dos pacientes portadores de poliomyosite eram HTLV-1-positivo (Morgan *et al.*, 1989). Em outro estudo realizado no Japão, foi demonstrado que a incidência de polimiosite associada à infecção pelo HTLV-1 era superior em áreas endêmicas para o vírus (Higuchi *et al.*, 1992).

A Figura 1.4 mostra o intenso infiltrado inflamatório, em caso de polimiosite associado à infecção pelo HTLV-1.



**Figura 1.4. Amostra de tecido muscular esquelético exibindo infiltrado inflamatório perimisial e atrofia de fibras.** Tecido muscular obtido através de biópsia de paciente HTLV-1<sup>+</sup> com polimiosite. Coloração por hematoxilina-eosina. Aumento de 40X. Adaptado de Oliveira *et al.*, 2000.

Foi demonstrado que, em lesões musculares de pacientes HTLV-1-positivos, a marcação para o vírus coincide com a presença de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Higuchi *et al.*, 1996), e de linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos para Tax (Ozden *et al.*, 2004). Estes dados sugerem que a polimiosite não estaria associada a um efeito direto do vírus sobre fibras musculares, e sim mediado por células do sistema imune sob o impacto da infecção pelo HTLV-1.

Por outro lado, foram relatados casos de miosite esporádica com corpos de inclusão durante a infecção pelo HTLV-1, e que a progressão da doença poderia requerer persistência viral e ativação de resposta inflamatória direta anti-vírus ou anti-músculo, com a possibilidade inclusive de o HTLV-1 induzir doença autoimune no tecido muscular (Ozden *et al.*, 2001).

A ativação da resposta imune no tecido muscular, causada pelo HTLV-1, leva ao aumento dos níveis de citocinas no tecido e, ainda, ao aumento da expressão de

moléculas de adesão (Dalakas & Sivakumar, 1996), o que pode estar associado ao desenvolvimento das lesões observadas em biópsias musculares. Neste contexto, o entendimento sobre o papel da ativação de linfócitos e secreção de citocinas, induzidas pelo vírus durante a infecção, é de grande importância para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos associados à infecção pelo HTLV-1. Em vista disto, Ozden e colaboradores (2005), utilizaram um modelo *in vitro* de estudo, utilizando cultivos de miotubos humanos diferenciados, com o objetivo de determinar os efeitos de uma linhagem de linfócitos infectados pelo HTLV-1 sobre células musculares. Os autores mostraram que o contato de linfócitos infectados gerava um encolhimento ou estreitamento de fibras musculares após adesão às células infectadas. O mesmo efeito se repetiu em ensaio, no qual, as fibras musculares forma expostas apenas ao sobrenadante de cultivos de linfócitos infectados. Estes dados sugerem que tanto o contato celular, como o contato com moléculas solúveis produzidas pelas células infectadas, são capazes de gerar efeito de encolhimento em fibras musculares *in vitro*. Por outro lado, quando o sobrenadante da cultura de linfócitos infectados foi tratado previamente com soro de paciente TSP/HAM, o fenômeno foi revertido, ou seja, anticorpos anti-HTLV-1 poderiam inibir fatores virais solúveis, resultando na reversão do encolhimento das fibras musculares *in vitro*. (Ozden *et al.*, 2005). Pelo fato de pacientes TSP/HAM possuírem altos títulos de anticorpos anti-Tax no soro, uma hipótese discutida pelos autores seria a de que a proteína Tax, secretada por células HTLV-1<sup>+</sup>, estaria envolvida na geração dessas mudanças morfológicas.

No entanto, não foram encontradas evidências de infecção em células musculares *in vivo*, sendo a detecção do HTLV-1 no músculo restrita às células do infiltrado inflamatório (Higuchi *et al.*, 1995).

Em experimentos realizados com biópsias musculares de pacientes HTLV-1-positivos com miosite, foram encontradas evidências de atrofia muscular, presença de linfócitos infectados pelo vírus e ainda linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativado específicos para proteína viral Tax (Ozden *et al.*, 2004). Isto indica que, a miosite provocada pela infecção do HTLV-1 resulta de uma sequência de eventos que geram um complexo quadro, no qual, fatores do sistema imune, componentes virais e, ainda, mecanismos celulares do próprio tecido muscular, estariam envolvidos. No entanto, a sequência real de eventos que ocorrem no processo fisiopatológico de miosites associadas ao HTLV-1 continua desconhecida. Sem dúvida, dentre os eventos cruciais está o recrutamento de células inflamatórias para o tecido muscular, assim como sua permanência no sítio de lesão.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO GERAL

Pacientes infectados pelo Vírus linfotrófico humano de células T (HTLV), podem desenvolver a síndrome neurológica conhecida como, paraparesia espástica tropical associada ao HTLV (TSP/HAM), pacientes acometidos por esta patologia podem apresentar casos de miosite. Em um estudo envolvendo pacientes com TSP/HAM e miosite, mostrou uma reação imune crônica, com a presença de células mononucleares positivas para Tax e linfócitos T citotóxicos anti-Tax nas lesões musculares (Ozden *et al.*, 2004). O vírus HTLV-1 já foi detectado em células T CD4<sup>+</sup>, mas não nas fibras musculares de pacientes (Leon-Monzon *et al.*, 1994).

Evidências da literatura dão suporte à hipótese de que a miosite associada ao HTLV-1 não se deve à persistência da infecção na fibra muscular, mas sim a um processo gerado pela presença de células mononucleares HTLV-1<sup>+</sup>, que infiltram no músculo e liberam citocinas e/ou a proteína Tax, induzindo modificações citopáticas. Tais alterações foram observadas 24 horas após o tratamento de culturas de mioblastos diferenciados com sobrenadante de células T HTLV-1<sup>+</sup>. Além disso, o efeito citopático foi inibido após a adição de soro oriundo de pacientes infectados pelo HTLV-1 (Ozden *et al.*, 2005).

Neste contexto, fica clara a correlação entre a presença de células migratórias e a patogênese da miosite em pacientes TSP/HAM.

Assim, nosso primeiro objetivo neste trabalho foi verificar a ocorrência de modulação de expressão gênica (em particular genes relacionados ao controle de migração celular) em células musculares humanas após exposição à fatores secretados por linfócitos T infectados pelo HTLV-1<sup>+</sup>.

Como segundo objetivo, verificar se a modulação de expressão gênica gerada pelos fatores secretados por linfócitos T HTLV-1 positivos seria um efeito específico de células infectadas pelo HTLV-1<sup>+</sup>.

Conceitualmente, o alcance de tal objetivo nos permitirá ter uma idéia mais clara sobre os mecanismos moleculares envolvidos no recrutamento de linfócitos T para o sítio muscular inflamado.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Cultivos celulares**

Neste trabalho utilizamos cultivos primários de mioblastos humanos, as células CHQ (Decary *et al.*, 1997), que são mantidas em meio de cultivo F10 (*Invitrogen, San Diego, CA, USA*), acrescido de 50µg/mL de gentamicina e 20% de soro fetal bovino (*Cultilab, Campinas, SP, Brasil*). Quando os cultivos de mioblastos se encontravam em alta confluência, o meio de cultivo era substituído pelo meio DMEM, suplementado com 1µg/mL de insulina e 10µg/mL de transferrina (Sigma, St Louis, USA). O meio DMEM estimula a diferenciação dos mioblastos em miotubos.

Também utilizamos a linhagem CIB de linfócitos T CD4<sup>+</sup> cronicamente infectados pelo HTLV-1, proveniente de paciente com TSP/HAM. Esta linhagem (gentilmente cedida pelo Dr. Olivier Hermine, Hospital Necker, Paris) foi mantida em meio RPMI 1640, com L-glutamina, penicilina, bicarbonato de sódio e HEPES (Sigma) e 10% de soro bovino fetal (*Cultilab, Campinas, SP, Brasil*), e ainda 1µg/mL de interleucina-2 recombinante humana (Sigma). Finalmente, alguns experimentos foram também realizados utilizando-se a linhagem Jurkat, de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Gillis & Watson, 1980) que serviu como controle de células T ativadas, mas não-infectadas pelo HTLV-1 (Pawelec *et al.*, 1983).

Todos os cultivos foram mantidos em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

#### **3.2 Ensaio de adesão entre linfócitos T infectados com HTLV-1 e células musculares diferenciadas.**

Nos ensaios de adesão foram distribuídos inicialmente 2,5 x 10<sup>5</sup> mioblastos em placas de Petri de 40 mm. Após 7 dias de cultivo foi detectada alta confluência dessas células. Neste momento, o meio de cultivo foi substituído pelo meio DMEM suplementado, induzindo diferenciação evidenciada após 4 dias de cultivo. Após este período, linfócitos T infectados pelo HTLV-1 foram adicionados às placas na proporção de 1:25 mioblastos. Após uma hora, os linfócitos não aderidos foram retirados e as placas foram coradas com Giemsa e fotografadas.

### **3.3. Ensaio de cultivo de miotubos com sobrenadante de linfócitos T infectados pelo HTLV-1**

Células CIB e Jurkat foram cultivadas em garrafas de cultura, na concentração inicial de  $3,5 \times 10^6$ /mL durante 24hs. O sobrenadante produzido por estas células, neste período, foi recolhido e concentrado utilizando-se o dispositivo centripep YM-50 e YM-30 (Millipore, USA), conforme instruções do fabricante. O concentrado de proteínas, de peso molecular variando de 30-50 KDa, foi diluído a 1:2 em tampão fosfato (PBS- 0,15M e pH 7,2; Sigma).

Em seguida este concentrado protéico foi adicionado às placas de Petri contendo miotubos. Após uma hora de tratamento, as células musculares foram lavadas com PBS e retiradas da placa com solução de tripsina/EDTA, a fim de dar continuidade à etapa de extração de RNA.

Como controle negativo, utilizamos cultivos de miotubos tratados apenas com PBS.

### **3.4. Extração de RNA total**

Para a extração de RNA total dos cultivos de células musculares utilizamos o kit RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), conforme instruções do fabricante. Este *kit* possui uma etapa na qual as amostras são tratadas com DNase. As amostras de RNA foram então, quantificadas com o auxílio de espectrofotômetro (nanodrop 2000, Thermo Scientific, USA). Em todos os experimentos utilizamos somente amostras livres de proteínas e livres de fenol, com razão  $A_{260}/A_{230} \approx 2,0$ . A integridade das amostras de RNA total foi avaliada utilizando-se gel de RNA desnaturante, de acordo com o protocolo descrito anteriormente (Sambrook J 1989). A agarose (Sigma) foi preparada em água Mili-Q autoclavada (1,5%), sendo a solução aquecida a 100°C. Após ligeiro resfriamento, a aproximadamente 60°C, foram adicionados 20ml de formaldeído (37%) e 22ml de tampão de migração 5 vezes concentrado (2% MOPS, ácido propano sulfônico 3-N-morfolino, em acetato de sódio 50mM, pH7,0, contendo 10ml de EDTA 0,5M pH8,0) (Sigma). Todos os equipamentos para a corrida do gel foram previamente tratados com NaOH 0,5M por 10 minutos, e lavados com água MiliQ autoclavada, para eliminação de RNases.

No processo de preparação das amostras foi utilizado 1 µg de RNA, sendo adicionados à esta solução 2 µl de tampão de migração 5 vezes concentrado, 3,5µl de

formaldeído (37%) e 10 µl de formamida. A solução final foi aquecida à 65°C por 15 minutos, e resfriada imediatamente no gelo. A eletroforese foi realizada a 80V por 3 horas. O gel foi corado com brometo de etídio 1% (Sigma) e a integridade do RNA foi avaliada quanto à presença dos RNAs ribossômicos 28S (4,8Kb) e 18S (1,9Kb), que aparecem como duas fortes bandas no gel.

### **3.5. Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa.**

O RNA total obtido das linhagens de células T infectadas pelo HTLV-1 ou não-infectada (Jurkat) foi submetido à reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR). Para a síntese do DNA complementar (cDNA), foram utilizados 2 µg de RNA total e o kit Superscrit II reverse Transcriptase (Invitrogen San Diego, USA), que contém todos os reagentes para a reação de transcriptase reversa, de acordo com as instruções dos fabricantes, em volume total de 20 µL. A PCR foi feita utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) 5' CGGATACCCIGTCTACGTGTTT e 5' CTGAGCIGAIAACGCGTCCA para o gene da Tax-1 (Lee *et al*, 2004) e 5' CCTCAGCCTCTGCCTCCCAGC e 5' ATCTCGCCGTCTCCAGGTCTGCCC para o gene que codifica a cadeia γ do complexo CD3 (Long *et al*, 1996), de acordo com os seguintes programas: 95°C – 5min, 40 ciclos (95°C – 30seg, 64°C – 30seg, 72°C – 45seg), 72°C – 10min para o gene Tax-1 e 95°C – 5min, 40 ciclos (95°C – 30seg, 58°C – 30seg, 72°C – 1min), 72°C – 10min.

Para a realização de RT-PCR em tempo real, foi utilizado 1 µg de RNA total de cada amostra de célula muscular. Para a obtenção do cDNA utilizamos o kit “RT<sup>2</sup> First Strand” (SABioscience, Maryland, USA), conforme instruções do fabricante. Após este procedimento, adicionamos ao cDNA o RT<sup>2</sup> SYBR Green/ROX PCR Master Mix (SABioscience) e água livre de nuclease, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida aplicamos 25 µl da mistura, por poço nas placas de 96 poços do kit “PCRArray - Extracellular matrix and adhesion molecules” (SABioscience), sendo uma amostra de RNA por placa. Essas placas contêm os iniciadores para 84 genes de interesse (Tabela 3.1), sendo que cada poço representa um gene. Além disso, as placas contêm poços para 5 genes constitutivos e para 7 poços controles: 1 poço para detecção de possível contaminação com DNA genômico, 3 poços controles da eficiência da reação de transcriptase reversa e 3 poços com controles positivos da PCR.

Ainda, utilizamos a ferramenta disponibilizada pela empresa Sabiosciences (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>), na qual verificamos a eficiência das reações e possíveis contaminações por DNA genômico (Anexo 1).

**Tabela 3.1: Lista de genes e controles presentes na placa de arranjo para PCR.**

<b>Sigla</b>	<b>Descrição</b>
ADAMTS1	ADAM metaloprotease com motivo 1 de trombospondina tipo1
ADAMTS13	ADAM metaloprotease com motivo 13 de trombospondina tipo1
ADAMTS8	ADAM metaloprotease com trombospondina tipo1 motivo 8
CD44	Porção protéica da proteoglicana Molécula CD44
CDH1	Caderina 1, tipo 1, E-caderina (epitelial)
CNTN1	Contactina 1
COL11A1	Cadeia alfa 1 de colágeno tipo XI,
COL12A1	Cadeia alfa 1 de colágeno tipo XII
COL14A1	Cadeia alfa 1 de colágeno tipo XIV
COL15A1	Cadeia alfa 1 de colágeno tipo XV
COL16A1	Cadeia alfa 1 de colágeno tipo XVI
COL1A1	Cadeia alfa 1 de colágeno tipo I
COL4A2	Cadeia alfa 2 de colágeno tipo IV
COL5A1	Cadeia alfa 1 de colágeno tipo V
COL6A1	Cadeia alfa 1 de colágeno tipo VI
COL6A2	Cadeia alfa 2 de colágeno tipo VI
COL7A1	Cadeia alfa 1 de colágeno tipo VII
COL8A1	Cadeia alfa 1 de colágeno tipo VIII
VCAN	Porção protéica da proteoglicana versicana
CTGF	Fator de crescimento de tecido conjuntivo
CTNNA1	Catenina (proteína associada à caderina), alfa 1, 102kDa
CTNNB1	Catenina (proteína associada à caderina), beta 1, 88kDa
CTNND1	Catenina (proteína associada à caderina), delta 1
CTNND2	Catenina (proteína associada à caderina), delta 2
ECM1	Molécula de Matriz Extracelular-1
FN1	Fibronectina- 1

<b>Sigla</b>	<b>Descrição</b>
HAS1	Sintetase do ácido hialurônico-1
ICAM1	Molécula de adesão Intercelular-1
ITGA1	Cadeia alfa-1 de integrina (CD49a, subunidade alfa 1 do receptor VLA-1)
ITGA2	Cadeia alfa-2 de integrina (CD49b, subunidade alfa 2 do receptor VLA-2)
ITGA3	Cadeia alfa-3 de integrina (CD49c, subunidade alfa 3 do receptor VLA-3)
ITGA4	Cadeia alfa-4 de integrina (CD49d, subunidade alfa 4 do receptor VLA-4)
ITGA5	Cadeia alfa-5 de integrina (CD49e, subunidade alfa 5 do receptor VLA-5)
ITGA6	Cadeia alfa-6 de integrina (CD49f, subunidade alfa 6 do receptor VLA-6)
ITGA7	Cadeia alfa-7 de integrina (subunidade alfa 7 do receptor $\alpha 7\beta 1$ )
ITGA8	Cadeia alfa-8 de integrina (subunidade alfa 8 do receptor $\alpha 7\beta 1$ )
ITGAL	Cadeia alfa-L de integrina (antígeno CD11aA (p180), do receptor LFA-1)
ITGAM	Integrina alfa M (receptor componente 3 do complemento, subunidade 3)
ITGAV	Integrina alfa V (receptor de vitronectina, polipeptídio alfa, antígeno CD51)
ITGB1	Cadeia beta-1 de integrina (CD29)
ITGB2	Cadeia beta-2 de integrina (receptor 3 de componente 3 do complemento e subunidade 4)
ITGB3	Cadeia beta-3 de integrina (glicoproteína plaquetária IIIa, antígeno CD61)
ITGB4	Cadeia beta-4 de integrina
ITGB5	Cadeia beta-5 de integrina
KAL1	Sequência síndrome de Kallmann 1
LAMA1	Cadeia alfa-1 de laminina
LAMA2	Cadeia alfa-2 de laminina
LAMA3	Cadeia alfa-3 de laminina
LAMB1	Cadeia beta-1 de laminina
LAMB3	Cadeia beta-3 de laminina
LAMC1	Cadeia gama 1 de laminina
MMP1	Metaloproteinase de Matriz 1 (colagenase intersticial)
MMP10	Metaloproteinase de Matriz 10 (estromelisina 2)
MMP11	Metaloproteinase de Matriz 11 (estromelisina 3)
MMP12	Metaloproteinase de Matriz 12 (elastase de macrófagos)
MMP13	Metaloproteinase de Matriz 13 (colagenase 3)
MMP14	Metaloproteinase de Matriz 14 (inserida na membrana)

<b>Sigla</b>	<b>Descrição</b>
MMP15	Metaloproteinase de Matriz 15 (inserida na membrana)
MMP16	Metaloproteinase de Matriz 16 (inserida na membrana)
MMP2	Metaloproteinase de Matriz 2 (gelatinase A, colagenase tipo IV de 72kDa)
MMP3	Metaloproteinase de Matriz 3 (estromelina 1, pro-gelatinase)
MMP7	Metaloproteinase de Matriz 7 (matrilisina, uterina)
MMP8	Metaloproteinase de Matriz 8 (neutrófilo colagenase)
MMP9	Metaloproteinase de Matriz 9 (gelatinase B, colagenase tipo IV de 92kDa)
NCAM1	Molécula de adesão celular neural-1
PECAM1	Molécula de adesão celular de plaqueta endotélio-1
SELE	Selectina E (CD62E)
SELL	Selectina L (CD62L)
SELP	Selectina P (proteína granular de membrana 140kDa, CD62P)
SGCE	Sarcoglicana epsilon
SPARC	Proteína secretada, ácida, rica em cisteína (osteonectina)
SPG7	Paraplegina
SPP1	Fosfoproteína Secretada -1
TGFBI	Fator de crescimento e transformação-induzido beta, 68kDa
THBS1	Trombospondina 1
THBS2	Trombospondina 2
THBS3	Trombospondina 3
TIMP1	Inibidor tecidual de metaloproteinase-1
TIMP2	Inibidor tecidual de metaloproteinase-2
TIMP3	Inibidor tecidual de metaloproteinase-3
CLEC3B	Membro B, família 3, domínio lectina tipo C
TNC	Tenascina C
VCAM1	Molécula de adesão celular Vascular- 1
VTN	Vitronectina
B2M	Beta-2-microglobulina
HPRT1	Hipoxantina fosforibosiltransferase 1
RPL13A	Proteína Ribosomal L13a
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
ACTB	Beta-actina

O processamento de sinal fluorescente das placas foi realizada no aparelho ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O programa para as etapas dos ciclos de amplificação das placas de arranjo utilizado foi: 95°C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento e extensão por 1 minuto a 60°C. Os produtos de PCR foram submetidos a uma análise da curva de dissociação.

### **3.6. Análise de expressão gênica**

A partir dos dados de acúmulo de fluorescência das reações de RT-PCR em tempo real de cada amostra, foi utilizado o ajuste de função logística, ou curva sigmóide, de quatro parâmetros para representar cada curva de amplificação, usando a biblioteca de funções qpcR (Ritz & Spiess, 2008) para a linguagem estatística R versão 2.11.0 (R Development Core Team, 2010). O ciclo de quantificação, ou C<sub>q</sub>, foi determinado pelo ponto de interseção entre a curva sigmóide ajustada e uma linha perpendicular ao ponto de máxima da segunda derivada dessa curva (ponto característico, ou *crossing point*). A eficiência de cada reação de amplificação foi calculada como a razão entre a fluorescência do ciclo de quantificação e a fluorescência do ciclo imediatamente anterior a esse. A eficiência estimada de cada gene foi obtida pela eficiência média, obtida a partir das eficiências calculadas para cada reação de amplificação daquele gene nos diferentes grupos biológicos. Genes empregados na normalização entre as diferentes amostras amplificadas foram selecionados pelos métodos geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) e NormFinder (Andersen *et al.*, 2004a). As comparações de médias dos valores de expressão normalizados entre os grupos foram realizadas por ANOVA one-way não paramétrica via permutação (n=1000) irrestrita (Basso *et al.*, 2009). A expressão normalizada dos diferentes grupos biológicos para cada gene-alvo foi representada em gráficos contendo média ± erro padrão. Níveis de significância bi-caudais menores ou iguais a 0,01, 0,05 e 0,1 foram considerados como “*altamente significantes*”, “*significantes*” e “*sugestivos*”, respectivamente.

### **3.7. Análises citofluorimétricas e de imunofluorescência**

Nas análises de citofluorimetria de mioblastos, primeiramente 10<sup>6</sup> células por poço foram aplicadas em uma placa de 96 poços. As células foram incubadas com soro humano por 30 minutos a 4°C, em seguida, com 10 µl de anticorpo monoclonal anti-

CD56 conjugado à phicoeritrina (BD Biosystems, San Diego, USA), por 30 minutos a 4°C. Como controle negativo de marcação, foi utilizada imunoglobulina não relacionada conjugada ao mesmo fluorocromo. Após a marcação, as suspensões celulares foram lavadas em PBS a 5% SFB, fixadas em solução contendo formaldeído 1% e adquiridas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, Mountain view, CA, USA) equipado com o programa CellQuest.

Nas análises de imunofluorescência de cultivos de miotubos, as células foram fixadas em metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos e conservadas a -20°C até o momento da marcação. Para a marcação utilizamos um anticorpo primário contra a cadeia pesada de miosina (Hybridoma Bank DSHB, Iowa City, IA), incubação de 1 hora, em seguida foi utilizando o anticorpo secundário conjugado ao fluorocromo alexa 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e por último, foi utilizado DAPI (4'-diamidino-2-phenylindole, Sigma), com incubação de 5 minutos. Para análise de imunofluorescência dos linfócitos infectados ou não -infectados pelo HTLV-1, foi realizada a técnica de *cytospin*, que permite a fixação de células em suspensão em lâminas de vidro; foram utilizadas  $2 \times 10^6$  células por lâmina, numa rotação de 400 rpm por 5 minutos. As lâminas foram então fixadas em metanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 5 minutos e conservadas a -20°C até o momento da marcação. Para avaliar a expressão de proteínas virais utilizamos o anticorpo monoclonal anti-gp46 (ABCAM, Cambridge, MA, USA) e o anticorpo secundário conjugado a Alexa 546 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

As marcações fluorescentes foram realizadas conforme o protocolo descrito a seguir. As lâminas foram incubadas durante 30 minutos com BSA 2,5% para bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida, adicionou-se o anticorpo primário diluído em PBS por 1 hora à temperatura ambiente. Após este período, foram feitas 3 lavagens de 5 minutos com PBS e, em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário por 45 minutos. As lâminas foram, então, lavadas novamente com PBS 3 vezes por 5 minutos.

Finalmente, as lâminas foram estocadas a -18° C em câmara escura, até o momento da análise em microscópio de fluorescência (Olympus BX60, Japão).

## 4. RESULTADOS

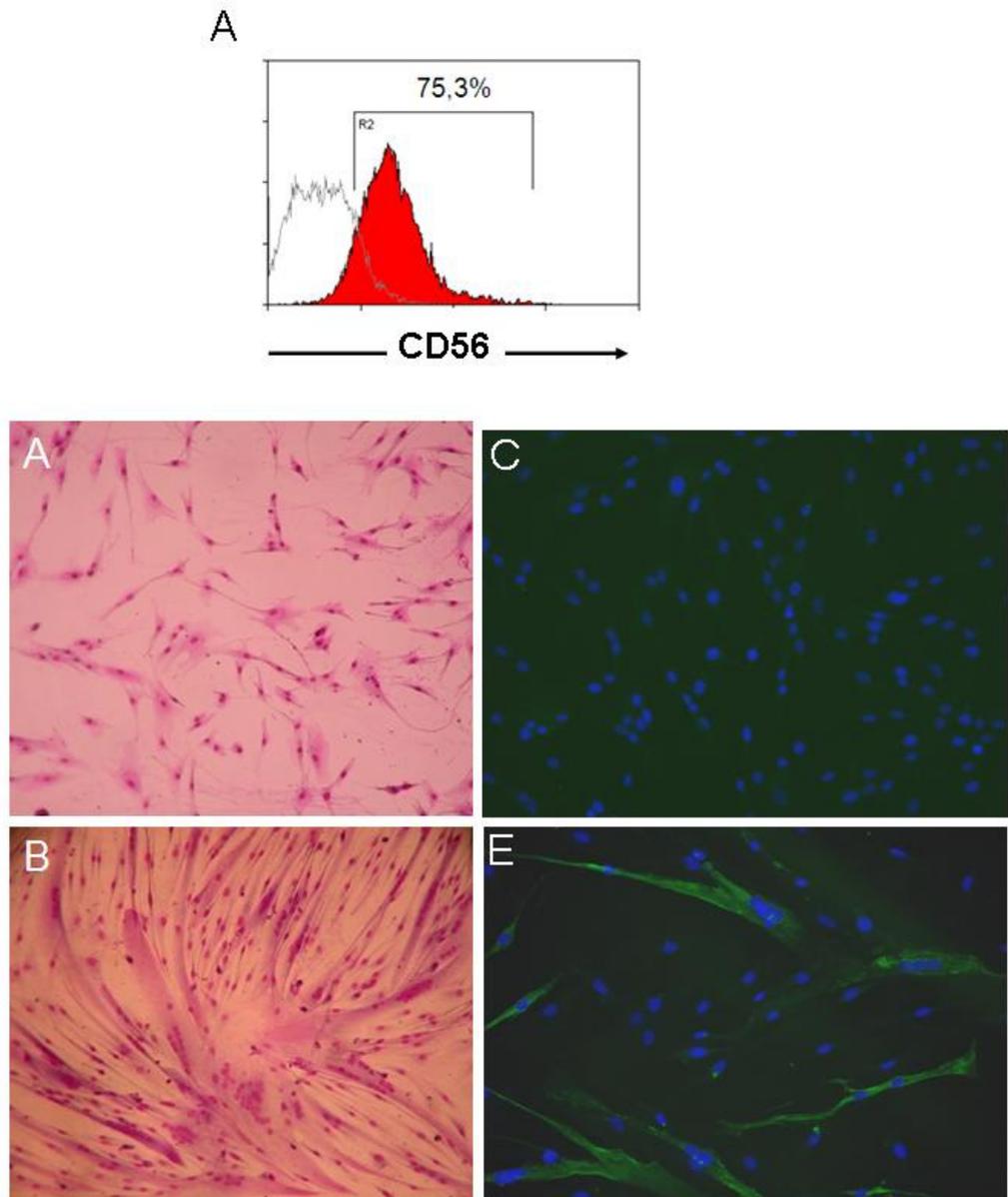
Evidências da literatura suportam a hipótese segundo a qual a miosite associada ao HTLV-1 não é devida à persistência da infecção na fibra muscular, mas sim a um processo induzido por células mononucleares HTLV-1<sup>+</sup> que infiltram o músculo e liberam citocinas e/ou a proteína Tax, induzindo modificações citopáticas. Através de um modelo *in vitro* que mimetiza interações de células musculares humanas com linfócitos infectados pelo HTLV-1, foram observadas mudanças citopáticas em fibras musculares, tanto na presença das células T infectadas, quanto na presença do respectivo sobrenadante de cultura (Ozden *et al.*, 2005).

Utilizando modelo semelhante, fomos avaliar se a exposição de fibras musculares humanas ao sobrenadante concentrado de linfócitos T infectados pelo HTLV-1 modularia a expressão gênica de moléculas relacionadas à migração celular. No entanto, diferindo de Ozden e colaboradores (2005), que utilizaram linhagens derivadas de pacientes portadores de ATL, utilizamos uma linhagem derivada de paciente com TSP/HAM, tendo sido o nosso primeiro passo a caracterização das células utilizadas nesse estudo.

### 4.1. Caracterização fenotípica dos cultivos de mioblastos humanos.

Conforme descrito no capítulo *Material e Métodos*, utilizamos cultivos primários de mioblastos humanos (figura 4.1B), que apresentavam cerca de 75-80% de miogenicidade, células com potencial miogênico, confirmada por citofluorimetria com base na expressão de CD56 (NCAM, *Neural adhesion molecule*), um marcador de célula satélite muscular (Renault *et al.*, 2002), conforme mostrado na figura 4.1A.

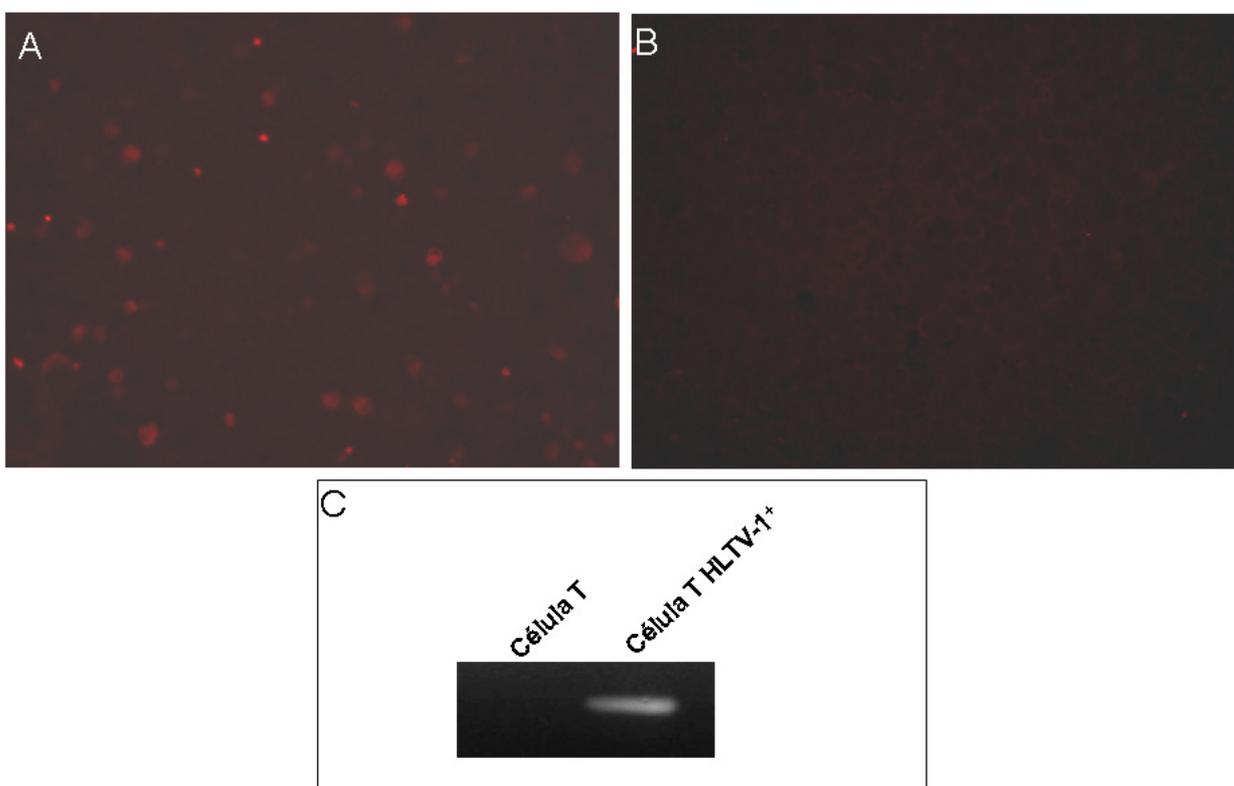
O próximo passo foi analisar a diferenciação dos mioblastos *in vitro*. A formação de miotubos é induzida pela alta confluência entre os mioblastos e pela eliminação do soro bovino fetal da cultura, e estes fatores promovem a fusão celular e a geração de células multinucleadas. De fato, os cultivos de mioblastos após a diferenciação apresentavam fenótipo característico de fibra muscular multinucleada (figura 4.1D), e expressavam a cadeia pesada da miosina (figura 4.1E).



**Figura 4.1. Caracterização da cultura de célula muscular esquelética antes e após diferenciação in vitro.** **A.** Histograma representativo de expressão da molécula CD56 em mioblastos humanos através de citofluorometria, utilizando anticorpo monoclonal anti-CD56 (curva cheia em vermelho), e controle da marcação com IgG (curva aberta em cinza). R2= indica a porcentagem de células CD56 positivas. **B.** Fotomicrografia de mioblastos humanos após coloração por Giemsa. **C.** Fotomicrografia de mioblastos humanos marcados por imunofluorescência com anticorpo anti-cadeia pesada da miosina (em verde) e Dapi (em azul). **D.** Fotomicrografia de miotubos após 4 dias de diferenciação, colorados com Giemsa. **E.** Fotomicrografia de miotubos humanos em verde positivos para a cadeia pesada da miosina, análise por imunofluorescência. Aumentos originais de 20X.

## 4.2. Expressão de proteínas virais na linhagem de linfócitos HTLV-1<sup>+</sup>

Conforme mencionado anteriormente, utilizamos uma linhagem de linfócitos T oriunda de paciente com TSP/HAM (CIB), nos ensaios de co-cultivo e de exposição ao sobrenadante concentrado. Com o objetivo de confirmar a infecção viral, tais células supostamente infectadas (figura 4.2A) e as células não infectadas (Jurkat), utilizadas como controle (figura 4.2B), foram marcadas com um anticorpo que reconhece a proteína do envelope viral gp46, comumente expressa em superfície de células HTLV-1<sup>+</sup> (Daenke & Booth, 2000). Além disso, verificamos a expressão do gene Tax-1 por RT-PCR nas células T infectadas pelo HTLV-1 e na linhagem de célula T CD4<sup>+</sup> humana não infectada, Jurkat (figura 4.2C).



**Figura 4.2. Caracterização da linhagem de células T infectadas com HTLV-1. A.** Fotomicrografia representativa de marcação da linhagem de linfócitos T infectada pelo HTLV-1, marcados por imunocitoquímica com anticorpo anti-gp46. **B.** Fotomicrografia dos linfócitos T não infectados, marcados com o mesmo anticorpo. **C.** Fotografia de gel de agarose mostrando fragmento do gene *Tax* amplificado por reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa, a partir de células T controle e infectadas pelo HTLV-1. Aumentos originais de 20X.

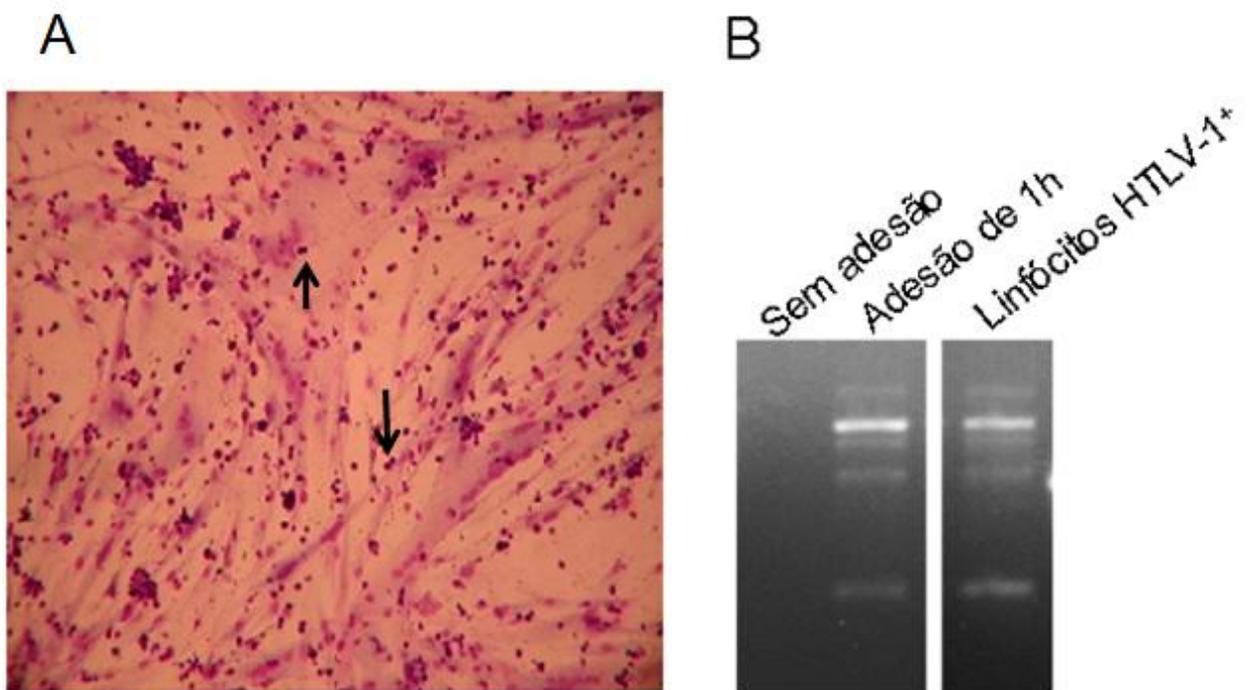
### 4.3 Co-cultivo de células musculares diferenciadas e linfócitos T HTLV-1<sup>+</sup>.

Após ter sido detectada a expressão de marcadores de diferenciação muscular nos nossos cultivos de células musculares diferenciadas, e gp46 e gene Tax pela linhagem de células T infectadas pelo HTLV-1, nosso próximo passo foi testar a capacidade de adesão da linhagem de célula T HTLV-1<sup>+</sup> às células musculares diferenciadas.

Ozden e colaboradores (2005) utilizaram ensaio de co-cultivo entre células musculares diferenciadas e linfócitos T oriundos de pacientes com ATL, e encontraram uma forte adesão dos linfócitos T infectados às células musculares após um dia de co-cultivo. Entretanto, pacientes com ATL não desenvolvem miosite, que é uma das manifestações clínicas que pode ocorrer em pacientes acometidos por TSP/HAM.

Sabendo que a miosite é induzida por células mononucleares HTLV-1<sup>+</sup> (Leon-Monzon *et al.*, 1994), procuramos estudar o efeito do contato direto, ou de fatores secretados por linfócitos infectados pelo HTLV-1, sobre a modulação da expressão gênica em células musculares humanas diferenciadas. Vimos que, de fato, as células T HTLV-1<sup>+</sup> oriundas de paciente com TSP/HAM são capazes de aderir às células musculares (Figura 4.3 A). Entretanto, notamos que, mesmo após sucessivas lavagens, ainda era possível detectar, por RT-PCR, a expressão do gene da cadeia  $\gamma$  do complexo CD3, gene este expresso apenas em linfócitos (Figura 4.3B). Essa forte adesão entre os linfócitos infectados às células musculares poderia gerar resultados de expressão gênica confusos, pois não poderíamos definir qual tipo celular seria responsável pela expressão dos genes estudados.

Em função deste obstáculo à realização do protocolo de adesão celular, e dos dados da literatura mostrando que fatores secretados por linfócitos T infectados são capazes de levar a alterações morfológicas de células musculares (Ozden, *et al.*, 2005), passamos em nossos próximos ensaios a avaliar células musculares humanas após a exposição à fatores solúveis liberados por linfócitos HTLV-1<sup>+</sup>.

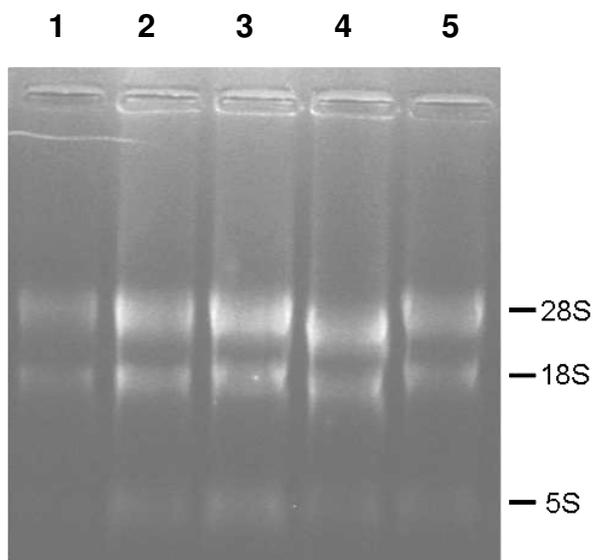


**Figura 4.3. Co-cultivo das células musculares diferenciadas com as células T HTLV-1+.** Células CIB obtidas de pacientes TSP/HAM foram adicionadas a cultura de células musculares, conforme descrito em material e métodos. Após a adesão, as células foram coradas com Giemsa **A**. Fotomicrografia mostrando a adesão de linfócitos HTLV-1<sup>+</sup> (setas em preto) sobre miotubos. Aumento de 20X. **B**. Fotografia de gel de agarose mostrando fragmentos correspondentes às diferentes isoformas do gene para cadeia  $\gamma$  do complexo CD3, através da técnica de amplificação por RT-PCR nas amostras de células musculares diferenciadas providas de ensaios de adesão, após extensa lavagem visando à retirada dos linfócitos. Como se nota na análise comparativa das colunas, há persistência de contaminação de genes expressos pelos linfócitos nos cultivos de células musculares, mesmo após extensa lavagem.

#### **4.4. Linfócitos T HTLV-1<sup>+</sup> secretam fatores capazes de modular genes relacionados à migração celular em células musculares diferenciadas**

Conforme detalhado no capítulo anterior, células musculares resultantes da diferenciação *in vitro* foram incubadas pelo período de uma hora com: (1) solução salina, PBS; (2) fração protéica de peso molecular na faixa 30-50 KDa, concentrada a partir do cultivo de 24 horas da linhagem de células T HTLV-1<sup>+</sup>; ou (3) fração protéica dentro da mesma faixa de peso molecular, a partir do cultivo da linhagem T Jurkat.

Após o tratamento de miotubos com os diferentes sobrenadantes fizemos a extração do RNA total dos cultivos de células musculares diferenciadas. Como demonstrado na figura 4.4, a integridade das amostras de RNA foi mantida.



**Figura 4.4. Fotografia representativa do gel de RNA desnaturante das amostras utilizadas na RT-PCR.** A barra lateral à direita indica os pesos moleculares relativos às bandas de RNA ribossômico 28S, 18S e 5S. No gel foram aplicadas amostras de miotubos tratados com PBS (colunas 1 e 2); miotubos tratados com sobrenadante de Jurkat (coluna 3) e miotubos tratados com sobrenadante de CIB (colunas 4 e 5).

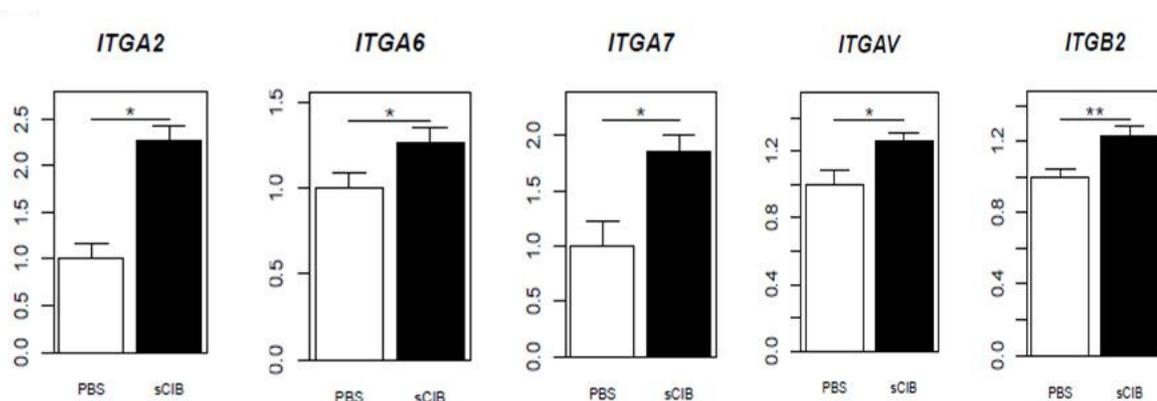
Para os ensaios de RT-PCR utilizamos somente RNAs livres de contaminação, e com a seguinte replicação: 7 replicatas biológicas para PBS; 6 replicatas biológicas para a fração protéica da linhagem de célula T infectada com HTLV-1, e 6 replicatas biológicas para a fração protéica da linhagem controle.

A partir dos dados de acúmulo de fluorescência das reações de RT-PCR em tempo real ( $\Delta R_n$ ), utilizando o método de quantificação por pontos característicos (máxima da segunda derivada), e considerando a eficiência de amplificação de cada gene como a média da eficiência estimada em cada curva sigmóide ajustada de 4 parâmetros (Ritz & Spiess, 2008), efetuamos a normalização dos genes-alvo a partir da média geométrica dos genes constitutivos *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1* e *RPL13A*, selecionados pelos métodos geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) e NormFinder (Andersen *et al.*, 2004b) como os mais adequados. Ao fim, comparamos os níveis médios de expressão de cada gene em seus grupos (PBS, sJUK ou sCIB) por ANOVA one-way não paramétrica via permutação ( $b=1000$ ) irrestrita, seguidas de pós-teste de

comparação entre pares com correção de testes múltiplos por Bonferroni (Basso 2009). A expressão normalizada dos diferentes grupos biológicos para cada gene alvo foi representada em gráficos contendo a média da razão de expressão em logaritmo de base 2 ( $\log_2FC$ )  $\pm$  erro padrão da média.

A análise de quantificação relativa descrita acima resultou em um perfil de expressão gênica da resposta das células musculares aos fatores solúveis liberados pela célula T infectada, quando comparamos o grupo controle (PBS) e o grupo tratado com a fração protéica de células infectadas com HTLV-1 (sCIB). Para melhor visualização dos resultados, os genes diferencialmente expressos foram agrupados em *grupos gênicos*.

No grupo gênico das integrinas, analisamos dezesseis genes conforme descrito na Tabela 3.1. Nossos resultados revelaram *aumento de expressão* em cinco deles, entre as condições PBS e sCIB: ITGA2 (cadeia alfa2); ITGA6 (cadeia alfa6); ITGA7 (cadeia alfa7); ITGAV (cadeia alfa V) e ITGB2 (cadeia beta 2) (Figura 4.5). Dentre eles, o gene ITGA2 foi aquele que apresentou maior razão de expressão,  $\log_2FC$  igual a 1,28, o que significa que a expressão deste gene foi 2,43 vezes maior na célula muscular tratada com o sobrenadante da célula infectada pelo HTLV-1, do que na célula tratada com solução salina.

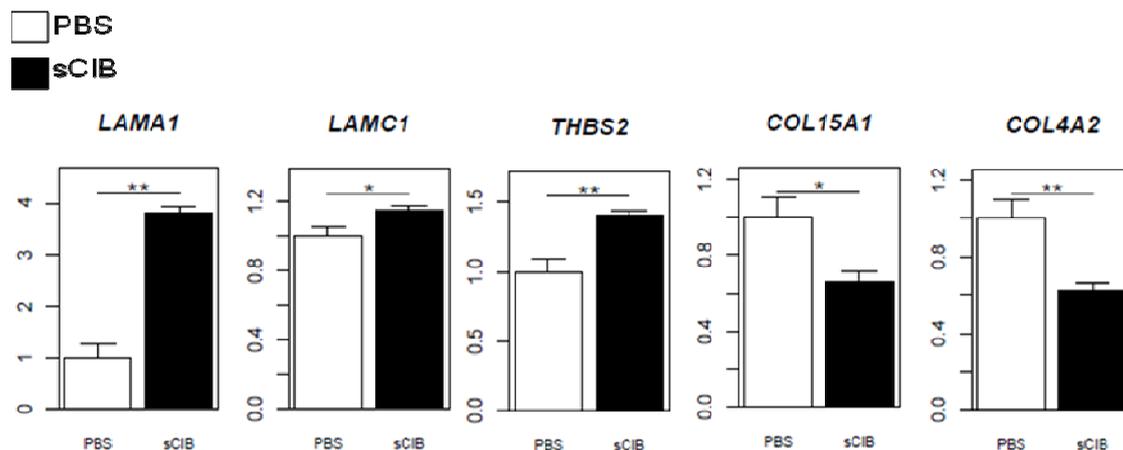


**Figura 4.5. Fatores solúveis de célula T infectada pelo HTLV-1 modulam a expressão gênica de integrinas em células musculares humanas diferenciadas.** Células musculares humanas foram tratadas com sobrenadante concentrado de células infectadas pelo HTLV-1 (sCIB), ou tratadas com solução salina (PBS) durante 1 hora. Em seguida, a expressão gênica de células musculares foi analisada através de RT-PCR em tempo real com seis replicatas.

Os símbolos representam: cadeia alfa 2 da integrina (ITGA2); cadeia alfa 6 da integrina (ITGA6); cadeia alfa7 da integrina (ITGA7); cadeia alfa V da integrina (ITGAV) e cadeia beta 2 da integrina (ITGB2). Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  erro padrão da expressão normalizada, \* $p < 0,05$ ; \*\* $< 0,01$ , por ANOVA one-way não paramétrica via permutação ( $b=1000$ ) irrestrita, seguidas de pós-teste de comparação entre pares com correção de testes múltiplos por Bonferroni.

No grupo gênico relacionado a proteínas de matriz extracelular observamos, em miotubos tratados com sobrenadante de células CIB, aumento da expressão dos genes que codificam as cadeias alfa 1 (LAMA1) e gama 1 (LAMC1) de laminina, sendo que o gene para a cadeia alfa 1 da laminina foi 4,68 vezes mais expresso (Figura 4.6). Além disso, foi detectado um aumento da molécula de matriz extracelular trombospondina-2.

Outro conjunto de proteínas de matriz extracelular, os colágenos, foi representado por doze genes na placa de arranjo para PCR. Neste grupo detectamos diminuição de expressão de dois genes: cadeia alfa-1 de colágeno tipo 15, (COL15A1) e cadeia alfa-2 de colágeno tipo 4 (COL4A2), ambos com expressão 50% menor, após o tratamento com sobrenadante concentrado de células infectadas pelo HTLV-1 em relação à solução salina (Figura 4.6).

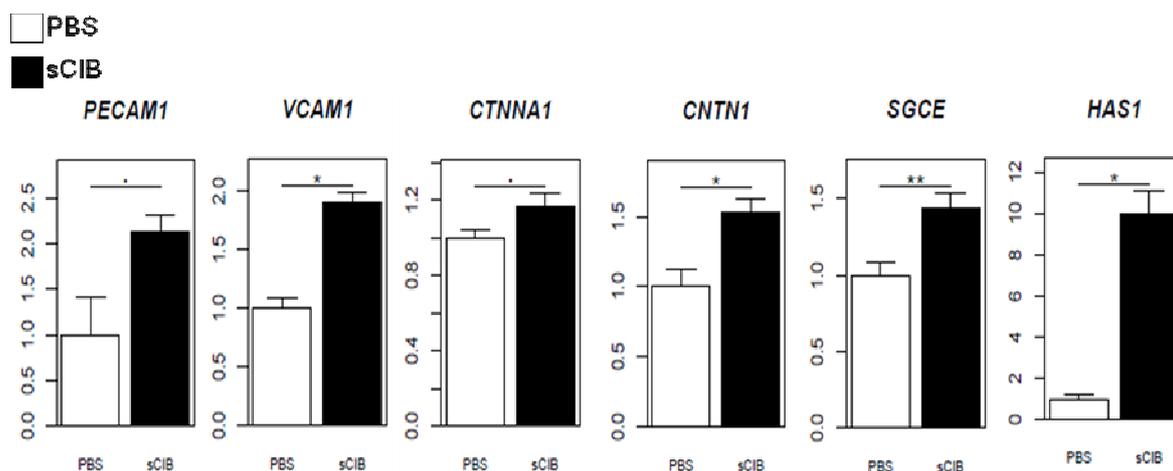


**Figura 4.6. Fatores solúveis da célula T infectada modulam a expressão gênica de moléculas de matriz extracelular em células musculares humanas diferenciadas.**

Células musculares humanas foram tratadas com sobrenadante concentrado de células infectadas pelo HTLV-1 (sCIB), ou tratadas com solução salina (PBS) durante 1 hora. Em seguida, a expressão gênica de células musculares foi analisada através de RT-PCR em tempo real com seis replicatas. Os símbolos representam: LAMA1 - cadeia alfa1 de laminina; LAMC1 - cadeia gama1 da laminina; THBS2 – trombospondina 2; COL15A1 – cadeia alfa-1 de colágeno tipo 15; COL4A2 - cadeia alfa-2 de colágeno tipo 4. Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  erro padrão da expressão normalizada, \* $p < 0,05$ ; \*\* $< 0,01$ , por ANOVA one-way não paramétrica via permutação (b=1000) irrestrita, seguidas de pós-teste de comparação entre pares com correção de testes múltiplos por Bonferroni.

Com relação ao grupo de moléculas de adesão, encontramos aumento de expressão das moléculas PECAM-1, VCAM-1, contactina-1, envolvidas diretamente com adesão célula-célula, catenina alfa 1, porção intracelular de moléculas de caderina, e sarcoglicana epsilon componente intracelular do complexo distrofina-glicana presente no tecido muscular. A expressão destes genes encontra-se aumentada em células musculares tratadas sobrenadante concentrado de linfócitos infectados pelo HTLV-1 (Figura 4.7).

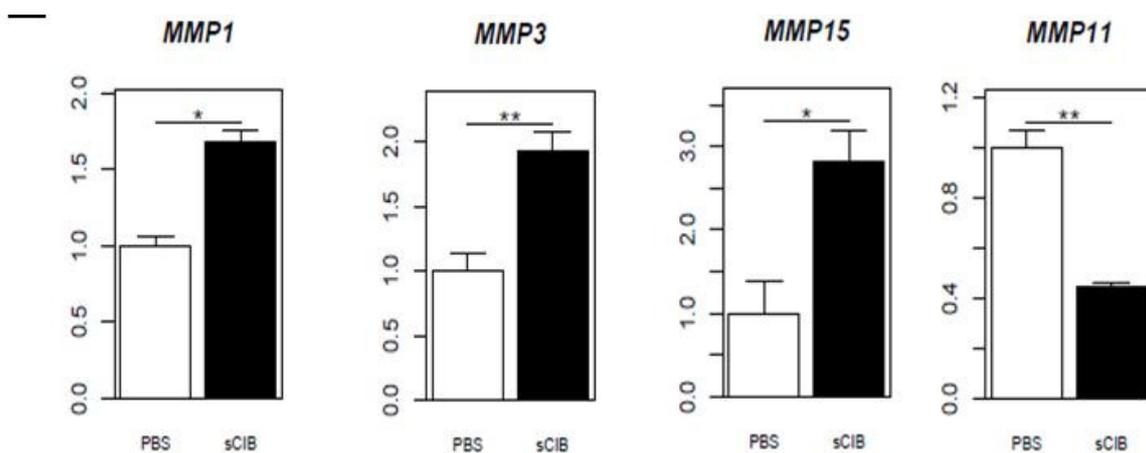
Além disso, encontramos aumento importante na expressão do gene que codifica a enzima ácido hialurônico sintetase-1 (HAS1). Este gene foi onze vezes mais expresso nas células tratadas com os fatores solúveis oriundos de célula T HTLV-1<sup>+</sup>(Figura 4.7).



**Figura 4.7. Fatores solúveis da célula T infectada modulam a expressão gênica de moléculas de adesão celular em células musculares humanas diferenciadas.**

Células musculares humanas foram tratadas com sobrenadante concentrado de células infectadas pelo HTLV-1 (sCIB), ou tratadas com solução salina (PBS) durante 1 hora. Em seguida, a expressão gênica de células musculares foi analisada através de RT-PCR em tempo real com seis replicatas. Os símbolos representam: PECAM1, molécula de adesão a plaquetas/células endoteliais 1; VCAM1 – molécula de adesão celular vascular 1; CTNNA1 – catenina alfa 1; CNTN1, contactina 1; SGCE, a sarcoglicana cadeia épsilon e HAS1 – sintetase de ácido hialurônico-1. Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  erro padrão da expressão normalizada, \* $p < 0,05$ ; \*\* $< 0,01$ ;  $0,1 < p > 0,05$ , por ANOVA one-way não paramétrica via permutação ( $b=1000$ ) irrestrita, seguidas de pós-teste de comparação entre pares com correção de testes múltiplos por Bonferroni.

O último grupo de genes diferencialmente expressos corresponde às metaloproteinases de matriz extracelular (Figura 4.8), grupo representado por treze genes analisados. Verificamos que a expressão de três deles (metaloproteinase 1, MMP1; metaloproteinase 3, MMP3; metaloproteinase 15, MMP15) aumentou no grupo tratado com sobrenadante concentrado de linfócitos HTLV-1<sup>+</sup>, com níveis de expressão variando entre 1,4 a 5 vezes maior, quando comparado com o grupo tratado com solução salina. Por outro lado, detectamos diminuição da expressão do gene que codifica a enzima MMP11.

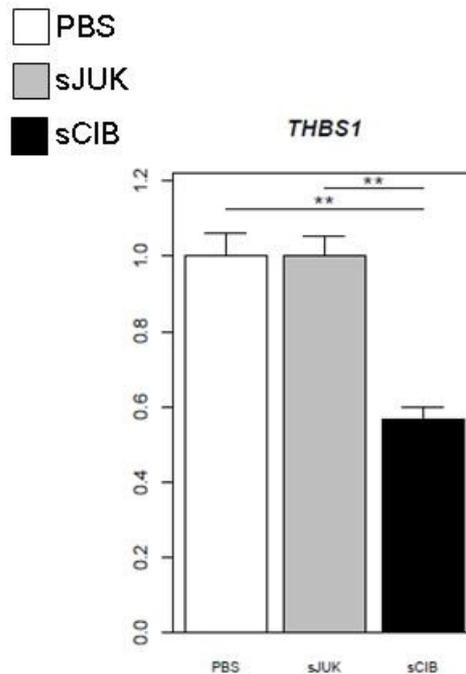


**Figura 4.8. Fatores solúveis de células T infectadas modulam a expressão gênica de metaloproteinases de matriz em células musculares humanas diferenciadas.**

Células musculares humanas foram tratadas com sobrenadante concentrado de células infectadas pelo HTLV-1 (sCIB), ou tratadas com solução salina (PBS) durante 1 hora. Em seguida, a expressão gênica de células musculares foi analisada através de RT-PCR em tempo real com seis replicatas. Os símbolos representam: MMP1 – metaloproteinase de matriz 1; MMP3 – metaloproteinase de matriz 3; MMP15 – metaloproteinase de matriz 15; MMP11 – metaloproteinase de matriz 11. Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  erro padrão da expressão normalizada, \* $p < 0,05$ ; \*\* $< 0,01$ , por ANOVA one-way não paramétrica via permutação ( $b=1000$ ) irrestrita, seguidas de pós-teste de comparação entre pares com correção de testes múltiplos por Bonferroni.

Nosso último objetivo foi avaliar se a modulação de expressão gênica, causada pelo tratamento de células musculares com sobrenadante concentrado de células T HTLV-1<sup>+</sup>, era um efeito exclusivo de linfócitos T infectados pelo HTLV-1. Para isto, foi realizada uma análise comparativa entre células musculares tratadas com sobrenadante concentrado de células T infectadas pelo HTLV-1 *versus* células musculares tratadas com sobrenadante concentrado de células T não infectadas.

Observamos que, o gene que codifica a proteína trombospondina-1 (THBS1) teve sua expressão diminuída em resposta ao tratamento com sobrenadante concentrado de células T HTLV-1<sup>+</sup> em comparação tanto com o tratamento com salina quanto com o sobrenadante concentrado de células não infectadas (Figura 4.9).



**Figura 4.9. Modulação negativa do gene de trombospondina-1 por fatores solúveis da célula HTLV-1+ em células musculares humanas diferenciadas.** Células musculares humanas foram tratadas com sobrenadante concentrado de células infectadas pelo HTLV-1 (sCIB), ou com sobrenadante concentrado de células T não infectadas (sJUK), ou tratadas com solução salina (PBS) durante 1 hora. Em seguida, a expressão gênica de células musculares foi analisada através de RT-PCR em tempo real com seis replicatas. Os resultados estão expressos em forma de média  $\pm$  erro padrão da expressão normalizada, \* $p < 0,05$ ; \*\* $< 0,01$ , por ANOVA one-way não paramétrica via permutação ( $b=1000$ ) irrestrita, seguidas de pós-teste de comparação entre pares com correção de testes múltiplos por Bonferroni.

A tabela com todos os valores da razão de expressão, assim como todos os valores de  $p$  associados encontra-se no anexo 2.

## 5. DISCUSSÃO

A infecção pelo HTLV-I está associada a diferentes tipos de patologias (ver item 1.4). No caso das miopatias inflamatórias, o tecido muscular sofre alterações que, podem gerar e/ou manter o processo inflamatório, e que podem ser ocasionadas pelo próprio processo inflamatório. Estas alterações envolvem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, aumento da expressão de moléculas de adesão, além de atrofia muscular.

O mecanismo pelo qual a infecção pelo HTLV-1I deflagra os danos na fibra muscular ainda não está claro; assim como também não estão esclarecidos quais seriam os mecanismos moleculares indutores da chegada e manutenção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> infectados, e de células T CD8<sup>+</sup>, específicas para a proteína viral tax, no músculo de pacientes acometidos por essa infecção (Gilbert *et al.*, 2001, Higuchi *et al.*, 1996, Jolly *et al.*, 2004). Proteínas de matriz extracelular possivelmente desempenham papel relevante na fisiopatologia das miopatias associadas ao HTLV-I, tendo em vista seu efeito haptotático no recrutamento de leucócitos.

Em função dos aspectos resumidos acima, nosso trabalho foi fundamentado em dois postulados principais: **a)** a miosite associada ao HTLV-1 seria mediada por células T infectadas e não estaria associada a um efeito direto do vírus sobre fibras musculares, e **b)** moléculas de adesão expressas pelo microambiente muscular seriam importantes na manutenção do infiltrado inflamatório local. Nesse contexto, quantificamos os níveis de expressão de genes relacionados ao controle de migração celular nos cultivos de células musculares humanas diferenciadas, após exposição à fatores solúveis secretados por linfócitos T HTLV-1<sup>+</sup>, linhagem derivada de paciente com TSP/HAM. Os dados assim obtidos permitiriam melhor compreender os possíveis mecanismos moleculares desencadeados por fatores solúveis derivados de linfócitos infectados sobre as células musculares e que, conseqüentemente, poderiam contribuir para o aumento do influxo de novas células inflamatórias.

A análise quantitativa da expressão gênica nas células musculares diferenciadas, após tratamento com sobrenadante concentrado de células T infectadas pelo HTLV-1, revelou aumento de expressão de vários genes relacionados à adesão/migração celular, dentre eles cinco genes que codificam diferentes cadeias de integrina: ITGA2 (cadeia alfa2); ITGA6 (cadeia alfa6); ITGA7 (cadeia alfa7); ITGAV (cadeia alfa V) e ITGB2 (cadeia beta 2) Figura 4.5.

As principais integrinas presentes no tecido muscular são:  $\alpha 5\beta 1$ , receptor clássico de fibronectina, e  $\alpha 6\beta 1$  e  $\alpha 7\beta 1$ , ambas receptores de laminina. É interessante notar que  $\alpha 5\beta 1$  e  $\alpha 6\beta 1$  têm sua expressão diminuída após a formação de miotubos, enquanto que  $\alpha 7\beta 1$  é principalmente restrita ao músculo esquelético e cardíaco (Boettiger *et al.*, 1995; Bronner-Fraser *et al.*, 1992; Yao *et al.*, 1996). Estudos anteriores mostraram que a integrina  $\alpha 7\beta 1$  tem grande importância durante a migração de mioblastos sobre laminina, e é fortemente expressa em miotubos na fase final de diferenciação, o que sugere a participação desta integrina na diferenciação de células musculares (Crawley *et al.*, 1997, Echtermeyer *et al.*, 1996). Já a cadeia alfa6, que forma os receptores de laminina  $\alpha 6\beta 1$  e  $\alpha 6\beta 4$ , aparece difusamente ao longo de miotubos, sugerindo uma possível associação com laminina, ricamente presente na membrana basal que circunda o músculo esquelético (Sastry *et al.*, 1996). Assim, o aumento destes receptores poderia aumentar a interação de células musculares com moléculas de laminina presentes na matriz extracelular do tecido muscular.

Durante o processo de miogênese, a cadeia  $\alpha V$  de integrina está inicialmente presente no desenvolvimento de miotubos, sendo posteriormente segregada às regiões estriadas em miotubos, o que sugere papel na fixação das miofibrilas (McDonald *et al.*, 1995). Além disso, associações da cadeia alfa V de integrina com cadeias de beta integrina, formando as integrinas  $\alpha V\beta 3$  e  $\alpha V\beta 5$  estão relacionadas com adesão celular de células precursoras musculares (Sinanan *et al.*, 2008).

Dentre as moléculas de matriz extracelular que funcionam como ligantes da integrina  $\alpha V\beta 3$  estão a trombospondina-1 e a vitronectina (Sipes *et al.*, 1999). Cabe salientar que já foi observado aumento da expressão de receptores de vitronectina em linfócitos T ativados (Luzina *et al.*, 2009). Neste sentido, o aumento de concentração local destes ligantes, poderia contribuir para a atração de células T ativadas, favorecendo, assim, a formação e a manutenção do infiltrado inflamatório.

Cabe aqui comentar que mudanças de expressão de determinadas integrinas podem estar relacionados a outros eventos biológicos na célula muscular. A literatura descreve um papel importante de moléculas de adesão na formação de sincício, que consiste na fusão celular com formação de células multinucleadas. Por exemplo, anticorpos anti-cadeia  $\beta 2$  de integrina reduzem a fusão celular induzida pelo HTLV-1 em células que expressam moléculas de adesão intercelular-1 ou -3 (ICAM-1 ou ICAM-3) (Daenke *et al.*, 1999). Em nossos experimentos de adesão de células T infectadas pelo HTLV-1 sobre células musculares diferenciadas, não detectamos a formação de sincício. Entretanto, observamos uma forte adesão dos linfócitos infectados à célula

muscular, de tal modo que não nos foi possível retirar completamente os linfócitos aderidos aos cultivos de células musculares, mesmo após extensivas lavagens. Assim, outros estudos serão necessários para definir se o aumento de expressão dos genes que codificam essas moléculas de adesão é relevante na adesão dos linfócitos infectados à fibra muscular.

Com relação às interações que envolvem moléculas de adesão celular, observamos aumento de expressão de VCAM-1 e PECAM-1 (Figura 4.7) nas células musculares tratadas com produtos de secreção de linfócitos HTLV-1<sup>+</sup>, quando comparados ao tratamento com PBS. No caso de VCAM-1, molécula que funciona como ligante de VLA-4 (integrina  $\alpha 4\beta 1$ ), é possível que o aumento de sua expressão facilite a adesão de linfócitos às células musculares, resultando numa intensificação da resposta imune local. VCAM-1 também foi descrita como molécula acessória ou potencial co-receptor para a fusão celular induzida por HTLV-1 (Hildreth *et al.*, 1997). Além disso, um estudo demonstrou que a transfecção de VCAM em linhagem eritroleucêmica K562, aumentou sua sensibilidade à formação de sincício induzida por HTLV-1 (Daenke, *et al.*, 1999).

Neste contexto, nossos dados mostram um aumento da expressão do gene que codifica VCAM-1 em cultivos de células musculares tratadas por fatores solúveis dos linfócitos infectados pelo HTLV-1, porém mais estudos devem ser realizados para o entendimento da relação deste aumento com a possível formação de sincício.

A molécula PECAM-1 pode se ligar a outras moléculas PECAM-1, além de se ligar a glicosaminoglicanas (Gandhi *et al.*, 2008), como por exemplo o ácido hialurônico ou hialuronato, uma molécula de matriz extracelular. Além disso, o hialuronato pode se ligar à molécula ICAM-1, cuja modulação gênica não foi encontrada em nosso trabalho. É importante citar que a expressão gênica da enzima responsável pela síntese do ácido hialurônico, a hialuronato-sintetase, está aumentada em nosso trabalho, e que a molécula CD44, expressa em células do infiltrado inflamatório, é capaz de se ligar ao hialuronato (Aruffo, 1996). Desta maneira, células do infiltrado inflamatório poderiam migrar mais facilmente através da ligação à moléculas de hialuronato. Estes eventos favoreceriam tanto a migração de células do infiltrado pela matriz extracelular, como a adesão destas ao tecido muscular.

Além de modulação de genes que codificam cadeias de integrinas e de outras moléculas de adesão, observamos também que moléculas de matriz extracelular têm sua expressão modulada em células musculares por efeito de fatores secretados por linfócitos T HTLV-1<sup>+</sup>. Vimos aumento de expressão de dois genes que codificam

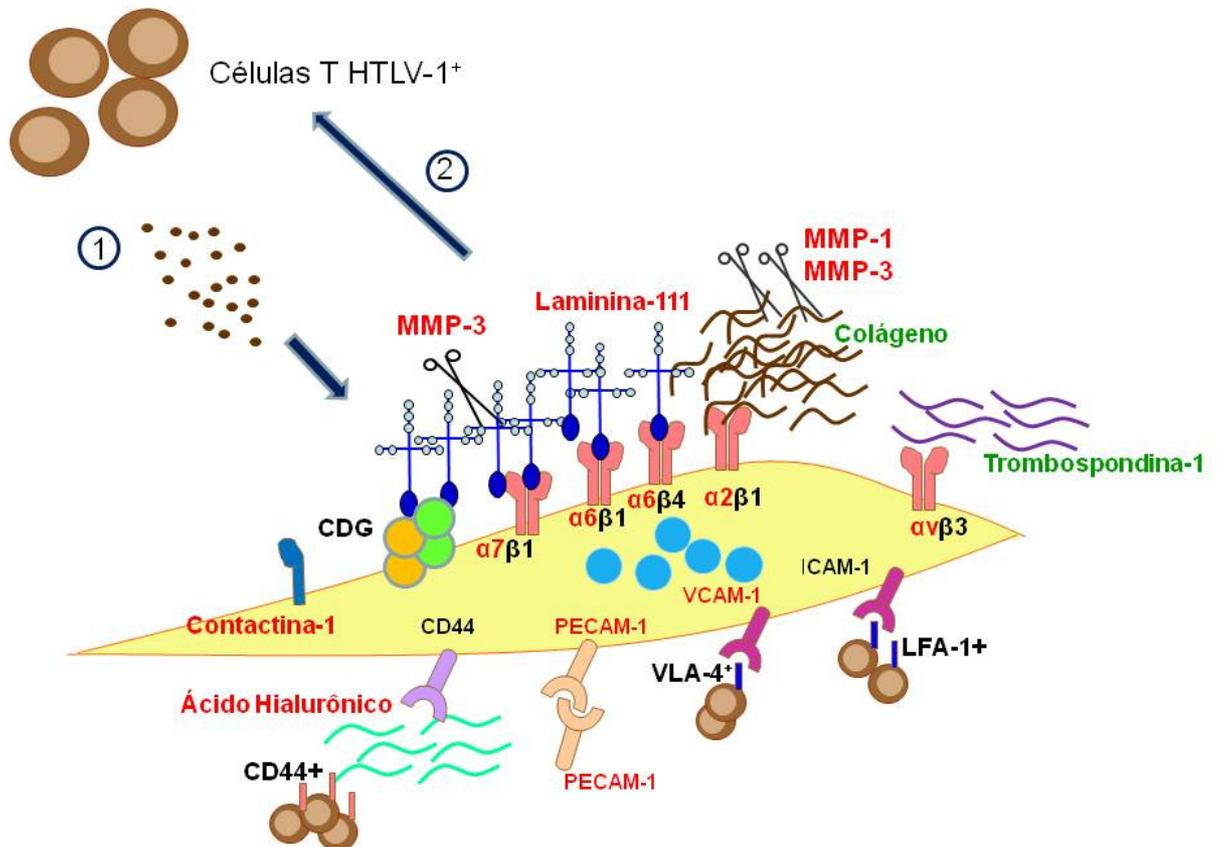
cadeias de laminina, sendo que o gene para a cadeia alfa-1 da laminina foi 4,68 vezes mais expresso. Considerando que, também há aumento de expressão gênica de integrinas receptores de laminina nas mesmas condições experimentais, é plausível supor que os fatores secretados pelos linfócitos HTLV-1<sup>+</sup> desencadeiem uma mudança na membrana da célula muscular, o que favoreceria a atração e adesão de novos linfócitos no tecido muscular, portanto, contribuindo na gênese e manutenção da miosite.

Outro gene cuja expressão foi aumentada, e cuja proteína está relacionada de forma indireta ao complexo distrofina-glicana, é o gene que codifica a contactina-1 (Figura 4.7). Esta proteína é encontrada em junções neuromusculares, e sua presença está relacionada à  $\alpha$ -dístroglicana (Compton *et al.*, 2008), molécula que compõe o complexo associado à distrofina e que se liga à laminina (Winder, 2001). Neste sentido, uma maior expressão de contactina-1 poderia favorecer ainda mais a ancoragem de laminina na membrana da célula muscular, por sua vez aumentando a capacidade haptotática frente aos linfócitos. No entanto, novos estudos devem ser realizados para uma melhor compreensão sobre o significado do aumento de expressão gênica de contactina-1 no contexto da miosite induzida pelo HTLV-I.

Além de moléculas de matriz extracelular e seus receptores, analisamos a expressão gênica de metaloproteinases de matriz (MMP), enzimas capazes de degradar proteínas de matriz extracelular, facilitando assim, a migração celular. Nossos dados revelaram aumento de expressão gênica de MMP-1, MMP-3 e MMP-15 no grupo de células musculares tratadas com sobrenadante de linfócitos HTLV-1<sup>+</sup>, com aumento dos níveis de expressão variando entre 1,4 a 5 vezes, quando comparado ao grupo controle tratado com PBS (Figura 4.8). É interessante notar que estas três MMPs são capazes de degradar laminina (Visse & Nagase, 2003). Por outro lado, observamos diminuição de expressão do gene que codifica MMP-11, cuja atividade proteolítica também inclui laminina como substrato de clivagem (Visse & Nagase, 2003). Tomados em conjunto, os dados discutidos acima sugerem que os efeitos de produtos secretados por linfócitos HTLV-1<sup>+</sup> modulam de forma bastante complexa as interações mediadas por laminina.

Ao analisarmos a expressão dos genes avaliados neste estudo, devemos levar em consideração que as moléculas observadas formam uma rede funcional. A compreensão das interações, e as consequências que elas trazem para célula muscular, sob influência de fatores secretados por linfócitos HTLV-1<sup>+</sup>, poderão fornecer importantes informações sobre as alterações detectadas no tecido muscular,

envolvidas com a formação e manutenção do processo inflamatório. A figura 5.1 procura ilustrar, ainda que de forma sucinta, tal conceito.



**Figura 5.1. Modulação gênica em células musculares diferenciadas, após tratamento com fatores solúveis produzidos por linfócitos infectados pelo vírus HTLV-1: possibilidade de tais genes favorecerem a entrada de novas células inflamatórias.** O esquema representa uma fibra muscular esquelética multinucleada (núcleos em azul) expressando diversos receptores, que podem estar envolvidos em interações moleculares que favorecem a atração de linfócitos infectados por HTLV-1 (esferas marrons). Os números 1 e 2 representam os produtos solúveis que modulam as células musculares (1) e o recrutamento de novas células para o sítio inflamatório (2). Em vermelho estão indicados os nomes de moléculas cujos genes apresentaram aumento de expressão, enquanto que as moléculas descritas em verde são aquelas cujos genes tiveram diminuição de expressão. As moléculas descritas em preto nas células musculares não sofreram modulação da expressão gênica. CDG – Complexo Distrofina-glicana.

Como podemos observar na figura, existe uma intensificação de certas relações entre moléculas e seus ligantes, como por exemplo, para as cadeias de integrina  $\alpha 2$ ,  $\alpha 6$  e  $\alpha 7$  que são capazes de se ligar a laminina-111 (associação das cadeia de laminina  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  e  $\gamma 1$ ). Isto indica que, na presença de fatores secretados por linfócitos, ocorra o aumento da rede de laminina e seus receptores, o que significa que células do infiltrado inflamatório terão mais substrato (laminina) para se ligarem e migrarem através do tecido, o que, por sua vez facilitaria o tráfego destas células no tecido, neste caso as células do infiltrado possuem receptores que reconhecem e se ligam à laminina, como por exemplo, a molécula de VLA-6 (integrina  $\alpha 6\beta 1$ ).

Além disso, o complexo glicoprotéico associado à distrofina também se liga à laminina. Este complexo composto por diferentes proteínas de membrana que interagem com a distrofina na porção intracelular, e com a laminina na porção extracelular, forma uma forte conexão entre proteínas do citoesqueleto e moléculas de matriz extracelular. Nosso trabalho mostrou que a molécula sarcoglicana épsilon, componente do complexo glicoprotéico associado à distrofina, pode ser induzida pela presença de fatores secretados por linfócitos infectados pelo HTLV-I, e que isto também poderia estar relacionado com o aumento da interação do complexo com laminina e, por sua vez, com a atividade haptotática desta molécula de matriz extracelular. Em termos de dinâmica tecidual, o aumento de expressão de MMPs capazes de degradar proteínas de matriz extracelular, incluindo a laminina, permitiria um maior *turnover* destas moléculas, facilitando inclusive a chegada de linfócitos até a célula muscular.

Nosso último objetivo foi determinar se a modulação na expressão gênica, causada pelos fatores solúveis de uma célula T infectada pelo HTLV-1, correspondia especificamente ao efeito da infecção sobre o estado de ativação dessas células, ou simplesmente, à ativação dos linfócitos. Já que a célula T não infectada (Jurkat), utilizada neste trabalho, possui um perfil de ativação, devido a sua capacidade de produzir a citocina IL-2 (Pawelec et al, 1982).

A análise comparativa entre as células musculares tratadas com sobrenadante de célula T infectada *versus* o sobrenadante de uma linhagem de células T não-infectadas, mas de fenótipo ativado, indicou apenas um gene diferencialmente modulado entre esses dois grupos. Esse gene, o TSBS1, que codifica a proteína

trombospondina 1 (THBS1), teve a expressão diminuída nas células tratadas com os fatores solúveis da célula T infectada (Figura 4.9).

Em vista disto, a modulação da maioria absoluta dos genes relacionados a moléculas de adesão seria decorrente de produtos solúveis liberados por diferentes linfócitos T ativados. De fato, ambas as linhagens de células T utilizadas nesse trabalho, Jurkat (não-infectada) e CIB (infectadas pelo HTLV-1), apresentam fenótipo ativado (Pawelec et al, 1982; Franchini, 1995). A literatura descreve que a persistência da infecção pelo HTLV-1 em linfócitos T resulta na mudança fenotípica dessas células para o estado ativado e secreção de citocinas pró-inflamatórias nos pacientes com TSP/HAM (Nakamura *et al.*, 1996). Essa interação complexa entre o HTLV-1 e as células-alvo do sistema imune resulta em um estado de ativação celular, gerando inflamação crônica. No entanto, a importância de fatores secretados por tais células na gênese e manutenção do processo inflamatório ainda está por ser determinada. Finalmente, o que nossos dados sugerem é que a grande parte das mudanças de expressão de genes relacionados à migração, em células musculares, decorre da secreção de fatores, como produto da ativação de linfócitos T infectados.

## 6. CONCLUSÕES E PERSPECIVAS

Em nosso trabalho, mostramos que linfócitos infectados pelo HTLV-I podem secretar fatores capazes de modular a expressão de genes relacionados à migração celular, como integrinas, moléculas de adesão e metaloproteínas em células musculares esqueléticas. A importância deste trabalho está relacionada à ocorrência de miopatia inflamatória em pacientes infectados pelo HTLV-1.

Como perspectivas deste trabalho, podemos citar a análise de outro conjunto de genes relacionados à migração celular, como quimiocinas e respectivos receptores, já incluídos nos ensaios.

Além disso, e com o objetivo de obtermos um quadro mais amplo sobre a capacidade de fatores solúveis oriundos de linfócitos T HTLV-1<sup>+</sup> modularem a expressão gênica em células musculares esqueléticas, realizamos recentemente experimentos de microarranjo de DNA com o genoma completo de cultivos de células musculares expostas a tais fatores solúveis. Os resultados de tais experimentos deverão nos fornecer um cenário mais amplo e mais complexo sobre o efeito de fatores solúveis produzidos por linfócitos T HTLV-1<sup>+</sup> sobre o padrão global de expressão gênica de células musculares esqueléticas, e que estariam relacionados com diversas funções biológicas, incluindo, por exemplo, a facilitação na formação de sincícios com linfócitos infectados.

Pretendemos, ainda, continuar nossos estudos para avaliar se as modulações de expressão gênica, que foram descritas neste trabalho, se refletem em níveis de expressão de proteínas. Assim, selecionaremos algumas das moléculas cuja expressão gênica foi alterada em nosso sistema, e utilizaremos as técnicas de *western blot* e imunohistoquímica, para avaliar sua produção.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

R Development Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.: Vienna, Austria.

Ades AE, Parker S, Walker J, Edginton M, Taylor GP, Weber JN (2000). Human T cell leukaemia/lymphoma virus infection in pregnant women in the United Kingdom: population study. *BMJ*, **320**: 1497-1501.

Afonso PV, Ozden S, Prevost MC, Schmitt C, Seilhean D, Weksler B *et al* (2007). Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization. *J Immunol* **179**: 2576-2583.

Alefantis T, Barmak K, Harhaj EW, Grant C, Wigdahl B (2003). Characterization of a nuclear export signal within the human T cell leukemia virus type I transactivator protein Tax. *J Biol Chem* **278**: 21814-21822.

Alefantis T, Jain P, Ahuja J, Mostoller K, Wigdahl B (2005). HTLV-1 Tax nucleocytoplasmic shuttling, interaction with the secretory pathway, extracellular signaling, and implications for neurologic disease. *J Biomed Sci* **12**: 961-974.

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF (2004a). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**: 5245-5250.

Andersen MH, Fensterle J, Ugurel S, Reker S, Houben R, Guldborg P *et al* (2004b). Immunogenicity of constitutively active V599EBRaf. *Cancer Res* **64**: 5456-5460.

Aruffo A (1996). CD44: one ligand, two functions. *J Clin Invest* **98**: 2191-2192.

Banerjee P, Sieburg M, Samuelson E, Feuer G (2008). Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection of CD34+ hematopoietic progenitor cells induces cell cycle arrest by modulation of p21(cip1/waf1) and survivin. *Stem Cells* **26**: 3047-3058.

Bangham CR (2003). The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *J Gen Virol* **84**: 3177-3189.

Bartoe JT, Albrecht B, Collins ND, Robek MD, Ratner L, Green PL *et al* (2000). Functional role of pX open reading frame II of human T-lymphotropic virus type 1 in maintenance of viral loads in vivo. *J Virol* **74**: 1094-1100.

Basso DPFSL (2009). Nonparametric One-way ANOVA, in permutations tests for Stochastic Ordering and ANOVA. *Lecture Notes in Statistics* **194**: 105-131.

Blattner WA, Kalyanaraman VS, Robert-Guroff M, Lister TA, Galton DA, Sarin PS *et al* (1982). The human type-C retrovirus, HTLV, in Blacks from the Caribbean region, and relationship to adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer* **30**: 257-264.

- Blayney DW, Jaffe ES, Blattner WA, Cossman J, Robert-Guroff M, Longo DL, et al. (1983). The human T-cell leukemia/lymphoma virus associated with American adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*. **62**:401-5.
- Boettiger D, Enomoto-Iwamoto M, Yoon HY, Hofer U, Menko AS, Chiquet-Ehrismann R (1995). Regulation of integrin alpha 5 beta 1 affinity during myogenic differentiation. *Dev Biol* **169**: 261-272.
- Boxus M, Twizere JC, Legros S, Dewulf JF, Kettmann R, Willems L (2008). The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* **5**: 76.
- Bronner-Fraser M, Artinger M, Muschler J, Horwitz AF (1992). Developmentally regulated expression of alpha 6 integrin in avian embryos. *Development* **115**: 197-211.
- Brown MJ, Shaw S (1999). T-cell activation: interplay at the interface. *Curr Biol* **9**: R26-28.
- Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R *et al* (2005). Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology* **2**: 30.
- Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB, Proietti FA (2005). 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. *Cad Saude Publica* **21**: 926-931.
- Chlichlia K, Khazaie K (2010). HTLV-1 Tax: Linking transformation, DNA damage and apoptotic T-cell death. *Chem Biol Interact* **188**: 359-365.
- Compton AG, Albrecht DE, Seto JT, Cooper ST, Ilkovski B, Jones KJ *et al* (2008). Mutations in contactin-1, a neural adhesion and neuromuscular junction protein, cause a familial form of lethal congenital myopathy. *Am J Hum Genet* **83**: 714-724.
- Cooper SA, van der Loeff MS, Taylor GP (2009). The neurology of HTLV-1 infection. *Pract Neurol* **9**: 16-26.
- Cowan EP, Alexander RK, Daniel S, Kashanchi F, Brady JN (1997). Induction of tumor necrosis factor alpha in human neuronal cells by extracellular human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax. *J Virol* **71**: 6982-6989.
- Crawley S, Farrell EM, Wang W, Gu M, Huang HY, Huynh V *et al* (1997). The alpha7beta1 integrin mediates adhesion and migration of skeletal myoblasts on laminin. *Exp Cell Res* **235**: 274-286.
- Daenke S, McCracken SA, Booth S (1999). Human T-cell leukaemia/lymphoma virus type 1 syncytium formation is regulated in a cell-specific manner by ICAM-1, ICAM-3 and VCAM-1 and can be inhibited by antibodies to integrin beta2 or beta7. *J Gen Virol* **80 ( Pt 6)**: 1429-1436.
- Daenke S, Booth S (2000). HTLV-1-induced cell fusion is limited at two distinct steps in the fusion pathway after receptor binding. *J Cell Sci* **113 ( Pt 1)**: 37-44.

- Dalakas MC, Sivakumar K (1996). The immunopathologic and inflammatory differences between dermatomyositis, polymyositis and sporadic inclusion body myositis. *Curr Opin Neurol* **9**: 235-239.
- Datta A, Silverman L, Phipps AJ, Hilaragi H, Ratner L, Lairmore MD (2007). Human T-lymphotropic virus type-1 p30 alters cell cycle G2 regulation of T lymphocytes to enhance cell survival. *Retrovirology* **4**: 49.
- de Oliveira Mde F, Bittencourt AL, Brites C, Soares G, Hermes C, Almeida FO (2004). HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in a 7-year-old boy associated with infective dermatitis. *J Neurol Sci* **222**: 35-38.
- Decary S, Mouly V, Hamida CB, Sautet A, Barbet JP, Butler-Browne GS (1997). Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther* **8**: 1429-1438.
- Dhib-Jalbut S, Hoffman PM, Yamabe T, Sun D, Xia J, Eisenberg H *et al* (1994). Extracellular human T-cell lymphotropic virus type I Tax protein induces cytokine production in adult human microglial cells. *Ann Neurol* **36**: 787-790.
- Ding W, Albrecht B, Kelley RE, Muthusamy N, Kim SJ, Altschuld RA *et al* (2002). Human T-cell lymphotropic virus type 1 p12(I) expression increases cytoplasmic calcium to enhance the activation of nuclear factor of activated T cells. *J Virol* **76**: 10374-10382.
- Donegan E, Lee H, Operskalski EA, Shaw GM, Kleinman SH, Busch MP *et al* (1994). Transfusion transmission of retroviruses: human T-lymphotropic virus types I and II compared with human immunodeficiency virus type 1. *Transfusion* **34**: 478-483.
- Duyao MP, Kessler DJ, Spicer DB, Sonenshein GE (1992). Transactivation of the c-myc gene by HTLV-1 tax is mediated by NFkB. *Curr Top Microbiol Immunol* **182**: 421-424.
- Echtermeyer F, Schober S, Poschl E, von der Mark H, von der Mark K (1996). Specific induction of cell motility on laminin by alpha 7 integrin. *J Biol Chem* **271**: 2071-2075.
- Ehrlich GD, Andrews J, Sherman MP, Greenberg SJ, Poiesz BJ (1992). DNA sequence analysis of the gene encoding the HTLV-I p21e transmembrane protein reveals inter- and inraisolate genetic heterogeneity. *Virology* **186**: 619-627.
- Franchini G (1995). Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood* **86**: 3619-3639.
- Francis K, Beek JV, Canova C, Neal JW, Gasque P (2003) Innate immunity and brain inflammation: the key role of complement. *Expert Rev Mol Med*. **5**:1-19.
- Gandhi NS, Coombe DR, Mancera RL (2008). Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) and its interactions with glycosaminoglycans: 1. Molecular modeling studies. *Biochemistry* **47**: 4851-4862.
- Gessain A, Saal F, Gout O, Daniel MT, Flandrin G, de The G *et al* (1990). High human T-cell lymphotropic virus type I proviral DNA load with polyclonal integration in peripheral blood mononuclear cells of French West Indian, Guianese, and African patients with tropical spastic paraparesis. *Blood* **75**: 428-433.

- Gilbert DT, Morgan O, Smikle MF, Simeon D, Barton EN (2001). HTLV-1 associated polymyositis in Jamaica. *Acta Neurol Scand* **104**: 101-104.
- Gillis S, Watson J (1980). Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med* **152**: 1709-1719.
- Goncalves DU, Guedes AC, Proietti AB, Martins ML, Proietti FA, Lambertucci JR (2003). Dermatologic lesions in asymptomatic blood donors seropositive for human T cell lymphotropic virus type-1. *Am J Trop Med Hyg* **68**: 562-565.
- Grant C, Barmak K, Alefantis T, Yao J, Jacobson S, Wigdahl B (2002). Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *J Cell Physiol* **190**: 133-159.
- Grossman WJ, Kimata JT, Wong FH, Zutter M, Ley TJ, Ratner L (1995). Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1057-1061.
- Hanon E, Stinchcombe JC, Saito M, Asquith BE, Taylor GP, Tanaka Y *et al* (2000). Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. *Immunity* **13**: 657-664.
- Higuchi I, Nerenberg M, Yoshimine K, Yoshida M, Fukunaga H, Tajima K *et al* (1992). Failure to detect HTLV-I by in situ hybridization in the biopsied muscles of viral carriers with polymyositis. *Muscle Nerve* **15**: 43-47.
- Higuchi I, Hashimoto K, Kashio N, Izumo S, Inose M, Izumi K *et al* (1995). Detection of HTLV-I provirus by in situ polymerase chain reaction in mononuclear inflammatory cells in skeletal muscle of viral carriers with polymyositis. *Muscle Nerve* **18**: 854-858.
- Higuchi I, Hashimoto K, Matsuoka E, Rosales R, Nakagawa M, Arimura K *et al* (1996). The main HTLV-I-harboring cells in the muscles of viral carriers with polymyositis are not macrophages but CD4+ lymphocytes. *Acta Neuropathol* **92**: 358-361.
- Hildreth JE, Subramaniam A, Hampton RA (1997). Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation mediated by vascular cell adhesion molecule-1: evidence for involvement of cell adhesion molecules in HTLV-1 biology. *J Virol* **71**: 1173-1180.
- Hisada M, Stuver SO, Okayama A, Li HC, Sawada T, Hanchard B *et al* (2004). Persistent paradox of natural history of human T lymphotropic virus type I: parallel analyses of Japanese and Jamaican carriers. *J Infect Dis* **190**: 1605-1609.
- Ijichi S, Izumo S, Eiraku N, Machigashira K, Kubota R, Nagai M *et al* (1993). An autoaggressive process against bystander tissues in HTLV-I-infected individuals: a possible pathomechanism of HAM/TSP. *Med Hypotheses* **41**: 542-547.
- Jeffery KJ, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J *et al* (1999). HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 3848-3853.

- Jeffery KJ, Siddiqui AA, Bunce M, Lloyd AL, Vine AM, Witkover AD *et al* (2000). The influence of HLA class I alleles and heterozygosity on the outcome of human T cell lymphotropic virus type I infection. *J Immunol* **165**: 7278-7284.
- Jolly C, Kashefi K, Hollinshead M, Sattentau QJ (2004). HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med* **199**: 283-293.
- Jones KS, Petrow-Sadowski C, Huang YK, Bertolette DC, Ruscetti FW (2008). Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat Med* **14**: 429-436.
- Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC (1982). A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* **218**: 571-573.
- Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y *et al* (1990). The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**: 1096-1101.
- Kim SJ, Kehrl JH, Burton J, Tendler CL, Jeang KT, Danielpour D *et al* (1990). 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* **172**: 121-129.
- Kodama D, Saito M, Matsumoto W, Sabouri AH, Izumo S, Arimura K *et al* (2004). Longer dinucleotide repeat polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) gene promoter which correlates with higher HTLV-I Tax mediated transcriptional activity influences the risk of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J Neuroimmunol* **156**: 188-194.
- Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira J, Iwamasa T *et al* (1993). In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* **196**: 25-33.
- Kubota R, Kawanishi T, Matsubara H, Manns A, Jacobson S (1998). Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-specific CD8+ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection. *J Immunol* **161**: 482-488.
- Lal RB, Giam CZ, Coligan JE, Rudolph DL (1994). Differential immune responsiveness to the immunodominant epitopes of regulatory proteins (tax and rex) in human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *J Infect Dis* **169**: 496-503.
- Lambert S, Bouttier M, Vassy R, Seigneuret M, Petrow-Sadowski C, Janvier S *et al* (2009). HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood* **113**: 5176-5185.
- Lee DK, Kim BC, Brady JN, Jeang KT, Kim SJ (2002). Human T-cell lymphotropic virus type 1 tax inhibits transforming growth factor-beta signaling by blocking the association of Smad proteins with Smad-binding element. *J Biol Chem* **277**: 33766-33775.

- Lee TH, Chafets DM, Busch MP, Murphy EL (2004). Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. *J Clin Virol* **31**:275-82.
- Lehky TJ, Flerlage N, Katz D, Houff S, Hall WH, Ishii K *et al* (1996). Human T-cell lymphotropic virus type II-associated myelopathy: clinical and immunologic profiles. *Ann Neurol* **40**: 714-723.
- Leon-Monzon M, Illa I, Dalakas MC (1994). Polymyositis in patients infected with human T-cell leukemia virus type I: the role of the virus in the cause of the disease. *Ann Neurol* **36**: 643-649.
- Levin MC, Lee SM, Kalume F, Morcos Y, Dohan FC, Jr., Hasty KA *et al* (2002). Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nat Med* **8**: 509-513.
- Lima MA, Bica RB, Araujo AQ (2005). Gender influence on the progression of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **76**: 294-296.
- Long H, Gaffney P, Mortari F, Miller JS (1996) CD3 $\gamma$ , CD3 $\sigma$ , and CD3 $\zeta$  mRNA in adult human marrow hematopoietic -progenitors correlates with surface CD2 and CD7 expression. *Experimental Hematology*,. **24**:1402-1408.
- Lu H, Pise-Masison CA, Linton R, Park HU, Schiltz RL, Sartorelli V *et al* (2004). Tax relieves transcriptional repression by promoting histone deacetylase 1 release from the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *J Virol* **78**: 6735-6743.
- Luzina IG, Todd NW, Nacu N, Lockett V, Choi J, Hummers LK *et al* (2009). Regulation of pulmonary inflammation and fibrosis through expression of integrins alphaVbeta3 and alphaVbeta5 on pulmonary T lymphocytes. *Arthritis Rheum* **60**: 1530-1539.
- Macatonia SE, Cruickshank JK, Rudge P, Knight SC (1992). Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**: 1699-1706.
- Mahieux R, Gessain A (2009). The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: new members of the HTLV family. *Pathol Biol (Paris)* **57**: 161-166.
- Majorovits E, Nejmeddine M, Tanaka Y, Taylor GP, Fuller SD, Bangham CR (2008). Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PLoS One* **3**: e2251.
- Maloney EM, Cleghorn FR, Morgan OS, Rodgers-Johnson P, Cranston B, Jack N *et al* (1998). Incidence of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica and Trinidad. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* **17**: 167-170.
- Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL (2003). The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* **115**: 449-459.

- Manns A, Blattner WA (1991). The epidemiology of the human T-cell lymphotropic virus type I and type II: etiologic role in human disease. *Transfusion* **31**: 67-75.
- Manns A, Hisada M, La Grenade L (1999). Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet* **353**: 1951-1958.
- Manuel SL, Schell TD, Acheampong E, Rahman S, Khan ZK, Jain P (2009). Presentation of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax protein by dendritic cells: the underlying mechanism of HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *J Leukoc Biol* **86**: 1205-1216.
- Marriott SJ, Semmes OJ (2005). Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response. *Oncogene* **24**: 5986-5995.
- Matsuura E, Umehara F, Nose H, Higuchi I, Matsuoka E, Izumi K *et al* (2008). Inclusion body myositis associated with human T-lymphotropic virus-type I infection: eleven patients from an endemic area in Japan. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**: 41-49.
- Mazurov D, Ilinskaya A, Heidecker G, Lloyd P, Derse D (2010). Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS Pathog* **6**: e1000788.
- McDonald KA, Lakonishok M, Horwitz AF (1995). Alpha v and alpha 3 integrin subunits are associated with myofibrils during myofibrillogenesis. *J Cell Sci* **108 ( Pt 3)**: 975-983.
- Morgan OS, Rodgers-Johnson P, Mora C, Char G (1989). HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet* **2**: 1184-1187.
- Morofuji-Hirata M, Kajiyama W, Nakashima K, Noguchi A, Hayashi J, Kashiwagi S (1993). Prevalence of antibody to human T-cell lymphotropic virus type I in Okinawa, Japan, after an interval of 9 years. *Am J Epidemiol* **137**: 43-48.
- Murphy EL, Hanchard B, Figueroa JP, Gibbs WN, Lofters WS, Campbell M *et al* (1989). Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer* **43**: 250-253.
- Nagai M, Kubota R, Greten TF, Schneck JP, Leist TP, Jacobson S (2001). Increased activated human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) Tax11-19-specific memory and effector CD8+ cells in patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV-I provirus load. *J Infect Dis* **183**: 197-205.
- Nagata K, Ohtani K, Nakamura M, Sugamura K (1989). Activation of endogenous c-fos proto-oncogene expression by human T-cell leukemia virus type I-encoded p40tax protein in the human T-cell line, Jurkat. *J Virol* **63**: 3220-3226.
- Nakagawa M, Izumo S, Ijichi S, Kubota H, Arimura K, Kawabata M *et al* (1995). HTLV-I-associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *J Neurovirol* **1**: 50-61.
- Nakamura T, Nishiura Y, Ichinose K, Shirabe S, Tsujino A, Goto H *et al* (1996). Spontaneous proliferation of and cytokine production by T cells adherent to human endothelial cells in patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Intern Med* **35**: 195-199.

Nejmeddine M, Barnard AL, Tanaka Y, Taylor GP, Bangham CR (2005). Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J Biol Chem* **280**: 29653-29660.

Nimer SD, Gasson JC, Hu K, Smalberg I, Williams JL, Chen IS *et al* (1989). Activation of the GM-CSF promoter by HTLV-I and -II tax proteins. *Oncogene* **4**: 671-676.

Ohtsuki Y, Akagi T, Takahashi K, Miyoshi I (1982). Ultrastructural study on type C virus particles in a human cord T-cell line established by co-cultivation with adult T-cell leukemia cells. *Arch Virol* **73**: 69-73.

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

Oliveira HA, Macieira JC, Fakhouri R (2000). Polimiosite associada à infecção por HTLV-1 relato de caso. *Arq Neuropsiquiatr*; **58**:935-938

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

Ozden S, Gessain A, Gout O, Mikol J (2001). Sporadic inclusion body myositis in a patient with human T cell leukemia virus type 1-associated myelopathy. *Clin Infect Dis* **32**: 510-514.

Ozden S, Cochet M, Mikol J, Teixeira A, Gessain A, Pique C (2004). Direct evidence for a chronic CD8+-T-cell-mediated immune reaction to tax within the muscle of a human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1-infected patient with sporadic inclusion body myositis. *J Virol* **78**: 10320-10327.

Ozden S, Mouly V, Prevost MC, Gessain A, Butler-Browne G, Ceccaldi PE (2005). Muscle wasting induced by HTLV-1 tax-1 protein: an in vitro and in vivo study. *Am J Pathol* **167**: 1609-1619.

Pais-Correia AM, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A *et al* (2010). Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med* **16**: 83-89.

Parker CE, Daenke S, Nightingale S, Bangham CR (1992). Activated, HTLV-1-specific cytotoxic T-lymphocytes are found in healthy seropositives as well as in patients with tropical spastic paraparesis. *Virology* **188**: 628-636.

Pawelec G, Borowitz A, Krammer PH, Wernet P (1982). Constitutive interleukin-2 production by the JURKAT human leukemic T cell line. *Eur J Immunol*. **12**:387-92.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 7415-7419.

Primo J, Siqueira I, Nascimento MC, Oliveira MF, Farre L, Carvalho EM *et al* (2009). 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* **42**: 761-764.

Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL (2005). Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* **24**: 6058-6068.

Renault V, Rolland E, Thornell LE, Mouly V, Butler-Browne G (2002). Distribution of satellite cells in the human vastus lateralis muscle during aging. *Exp Gerontol* **37**: 1513-1514.

Ritz C, Spiess AN (2008). qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. *Bioinformatics* **24**: 1549-1551.

Sabouri AH, Usuku K, Hayashi D, Izumo S, Ohara Y, Osame M *et al* (2008). Impaired function of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD8+ T cells in HTLV-1-associated neurologic disease. *Blood* **112**: 2411-2420.

Sambrook J *f*EMT (1989). *Cold Spring Harbor Press*: New York.

Sasaki D, Doi Y, Hasegawa H, Yanagihara K, Tsukasaki K, Iwanaga M *et al* (2010). High human T cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) provirus load in patients with HTLV-1 carriers complicated with HTLV-1-unrelated disorders. *Virology* **7**: 81.

Sastry SK, Lakonishok M, Thomas DA, Muschler J, Horwitz AF (1996). Integrin alpha subunit ratios, cytoplasmic domains, and growth factor synergy regulate muscle proliferation and differentiation. *J Cell Biol* **133**: 169-184.

Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, Matsuoka M (2006). HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 720-725.

Selmaj K, Raine CS, Farooq M, Norton WT, Brosnan CF (1991). Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol* **147**: 1522-1529.

Selmaj KW, Raine CS (1988). Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol* **23**: 339-346.

Sertoz R, Turhan A, Bozkurt H, Samlioglu P, Degirmenci A, Aydinok Y *et al* (2010). [Investigation of anti-HTLV I/II seroprevalence in healthy blood donors in Izmir region, Turkey]. *Mikrobiyol Bul* **44**: 579-584.

Shimoyama M (1991). Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol* **79**: 428-437.

Shinzato O, Kamihira S, Ikeda S, Kondo H, Kanda T, Nagata Y *et al* (1993). Relationship between the anti-HTLV-1 antibody level, the number of abnormal lymphocytes and the viral-genome dose in HTLV-1-infected individuals. *Int J Cancer* **54**: 208-212.

Sinanan AC, Machell JR, Wynne-Hughes GT, Hunt NP, Lewis MP (2008). Alpha v beta 3 and alpha v beta 5 integrins and their role in muscle precursor cell adhesion. *Biol Cell* **100**: 465-477.

Sipes JM, Krutzsch HC, Lawler J, Roberts DD (1999). Cooperation between thrombospondin-1 type 1 repeat peptides and alpha(v)beta(3) integrin ligands to promote melanoma cell spreading and focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem* **274**: 22755-22762.

Slattery JP, Franchini G, Gessain A (1999). Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *Genome Res* **9**: 525-540.

Smith MR, Greene WC (1992). Characterization of a novel nuclear localization signal in the HTLV-I tax transactivator protein. *Virology* **187**: 316-320.

Suemori K, Fujiwara H, Ochi T, Ogawa T, Matsuoka M, Matsumoto T *et al* (2009). HBZ is an immunogenic protein, but not a target antigen for human T-cell leukemia virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Gen Virol* **90**: 1806-1811.

Suzuki T, Yoshida M (1997). HTLV-1 Tax protein interacts with cyclin-dependent kinase inhibitor p16Ink4a and counteracts its inhibitory activity to CDK4. *Leukemia* **11 Suppl 3**: 14-16.

Tachibana N, Okayama A, Ishihara S, Shioiri S, Murai K, Tsuda K *et al* (1992). High HTLV-I proviral DNA level associated with abnormal lymphocytes in peripheral blood from asymptomatic carriers. *Int J Cancer* **51**: 593-595.

Takeda S, Maeda M, Morikawa S, Taniguchi Y, Yasunaga J, Nosaka K *et al* (2004). Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* **109**: 559-567.

Tanaka Y, Hayashi M, Takagi S, Yoshie O (1996). Differential transactivation of the intercellular adhesion molecule 1 gene promoter by Tax1 and Tax2 of human T-cell leukemia viruses. *J Virol* **70**: 8508-8517.

Trejo SR, Fahl WE, Ratner L (1997). The tax protein of human T-cell leukemia virus type 1 mediates the transactivation of the c-sis/platelet-derived growth factor-B promoter through interactions with the zinc finger transcription factors Sp1 and NGFI-A/Egr-1. *J Biol Chem* **272**: 27411-27421.

Tsukasaki K, Hermine O, Bazarbachi A, Ratner L, Ramos JC, Harrington W, Jr. *et al* (2009). Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *J Clin Oncol* **27**: 453-459.

Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H (1977). Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **50**: 481-492.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A *et al* (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**: RESEARCH0034.

Verdonck K, Gonzalez E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E (2007). Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis* **7**: 266-281.

Vine AM, Witkover AD, Lloyd AL, Jeffery KJ, Siddiqui A, Marshall SE *et al* (2002). Polygenic control of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis* **186**: 932-939.

Visse R, Nagase H (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92**: 827-839.

Wano Y, Feinberg M, Hosking JB, Bogerd H, Greene WC (1988). Stable expression of the tax gene of type I human T-cell leukemia virus in human T cells activates specific cellular genes involved in growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 9733-9737.

Winder SJ (2001). The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci* **26**: 118-124.

Yamaguchi K, Watanabe T (2002). Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. *Int J Hematol* **76 Suppl 2**: 240-245.

Yamashita M, Veronesi R, Menna-Barreto M, Harrington WJ, Jr., Sampio C, Brites C *et al* (1999). Molecular epidemiology of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) Brazil: the predominant HTLV-1s in South America differ from HTLV-1s of Japan and Africa, as well as those of Japanese immigrants and their relatives in Brazil. *Virology* **261**: 59-69.

Yao CC, Ziober BL, Sutherland AE, Mendrick DL, Kramer RH (1996). Laminins promote the locomotion of skeletal myoblasts via the alpha 7 integrin receptor. *J Cell Sci* **109 ( Pt 13)**: 3139-3150.

Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y (1982). Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 2031-2035.

Yoshida M (2001). Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol* **19**: 475-496.

Younis I, Green PL (2005). The human T-cell leukemia virus Rex protein. *Front Biosci* **10**: 431-445.

Zipp F, Weber F, Huber S, Sotgiu S, Czlonkowska A, Holler E *et al* (1995). Genetic control of multiple sclerosis: increased production of lymphotoxin and tumor necrosis factor-alpha by HLA-DR2+ T cells. *Ann Neurol* **38**: 723-730.

# Anexo 1- Análise de qualidade das placas de PCR array: reprodutibilidade, eficiência das reações e contaminação com DNA genômico.

## RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis



### 1. PCR Array Reproducibility:

Array	A-PBS	B-PBS	C-PBS	D-PBS	E-PBS	F-PBS	G-PBS	AVG	ST DEV
Average Ct (PPC)	20.67	20.78	20.82	20.13	19.93	20.2	20.24	20.4	0.35
ST DEV C <sub>t</sub> (PPC)	0.03	0.12	0.06	0.15	0.31	0.04	0.07	0.11	--
Average C <sub>t</sub> (RTC)	25.24	25.34	25.34	23.89	24.81	25.56	25.25	25.06	0.56
ST DEV C <sub>t</sub> (RTC)	0.04	0.09	0.07	0.04	0.07	0.02	0.05	0.05	--

### 2. Reverse Transcription Control (RTC):

Array	A-PBS	B-PBS	C-PBS	D-PBS	E-PBS	F-PBS	G-PBS
Delta C <sub>t</sub> (AVG RTC - AVG PPC)	4.57	4.56	4.52	3.76	4.88	5.36	5.01
RT Efficiency	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Inquiry	Inquiry

Criteria: If Delta C<sub>t</sub> (AVG RTC - AVG PPC) <= 5, RT Efficiency reports 'Pass'; otherwise, RT Efficiency reports 'Inquiry'.  
See the Troubleshooting Guide of the PCR Array User Manual or Contact Technical Support at 888-503-3187.

### 3. Genomic DNA Contamination (GDC):

Array	A-PBS	B-PBS	C-PBS	D-PBS	E-PBS	F-PBS	G-PBS
C <sub>t</sub> (GDC)	35	35	35	35	35	35	35
Genomic DNA	Pass						

### 1. PCR Array Reproducibility:

Array	A-sJUK	B-sJUK	C-sJUK	D-sJUK	E-sJUK	F-sJUK	AVG	ST DEV
Average Ct (PPC)	20.64	21.05	20.77	20.82	20.5	21.62	20.9	0.4
ST DEV C <sub>t</sub> (PPC)	0.2	0.05	0.07	0.11	0.09	0.07	0.1	--
Average C <sub>t</sub> (RTC)	24.97	25.39	25.37	25.24	24.83	26.01	25.3	0.41
ST DEV C <sub>t</sub> (RTC)	0.07	0.04	0.05	0.16	0.04	0.09	0.08	--

### 2. Reverse Transcription Control (RTC):

Array	A-sJUK	B-sJUK	C-sJUK	D-sJUK	E-sJUK	F-sJUK
Delta C <sub>t</sub> (AVG RTC - AVG PPC)	4.33	4.34	4.6	4.42	4.33	4.39
RT Efficiency	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass

Criteria: If Delta C<sub>t</sub> (AVG RTC - AVG PPC) <= 5, RT Efficiency reports 'Pass'; otherwise, RT Efficiency reports 'Inquiry'.  
See the Troubleshooting Guide of the PCR Array User Manual or Contact Technical Support at 888-503-3187.

### 3. Genomic DNA Contamination (GDC):

Array	A-sJUK	B-sJUK	C-sJUK	D-sJUK	E-sJUK	F-sJUK
C <sub>t</sub> (GDC)	35	35	35	35	35	35
Genomic DNA	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass

### 1. PCR Array Reproducibility:

Array	A-sCIB	B-sCIB	C-sCIB	D-sCIB	E-sCIB	F-sCIB	AVG	ST DEV
Average Ct (PPC)	20.82	20.78	20.66	20.95	20.52	20.63	20.73	0.15
ST DEV C <sub>t</sub> (PPC)	0.08	0.03	0.07	0.07	0.09	0.09	0.07	--
Average C <sub>t</sub> (RTC)	24.73	24.89	24.83	24.9	24.98	25.17	24.92	0.15
ST DEV C <sub>t</sub> (RTC)	0.08	0.05	0.06	0.03	0.09	0.04	0.06	--

### 2. Reverse Transcription Control (RTC):

Array	A-sCIB	B-sCIB	C-sCIB	D-sCIB	E-sCIB	F-sCIB
Delta C <sub>t</sub> (AVG RTC - AVG PPC)	3.91	4.11	4.17	3.95	4.46	4.54
RT Efficiency	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass

Criteria: If Delta C<sub>t</sub> (AVG RTC - AVG PPC) <= 5, RT Efficiency reports 'Pass'; otherwise, RT Efficiency reports 'Inquiry'.  
See the Troubleshooting Guide of the PCR Array User Manual or Contact Technical Support at 888-503-3187.

### 3. Genomic DNA Contamination (GDC):

Array	A-sCIB	B-sCIB	C-sCIB	D-sCIB	E-sCIB	F-sCIB
C <sub>t</sub> (GDC)	35	35	35	35	35	35
Genomic DNA	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass	Pass

Criteria: If C<sub>t</sub>(GDC) >= 35, then the GDC QC reports 'Pass'; if C<sub>t</sub>(GDC) < 35, then the GDC QC reports 'Inquiry'.  
See the Troubleshooting Guide of the PCR Array User Manual or Contact Technical Support at 888-503-3187.

Anexo 2- A tabela com os valores da razão de expressão e os valores de  $p$  associados.

Genes	Valor de $p$ Global	PBS x sJUK		PBS x sCIB		sJUK x sCIB	
		LogFC	Valor de $p$	LogFC	Valor de $p$	LogFC	Valor de $p$
ADAMTS1	6	-0,66041	0,00300	-0,21375	1,00000	0,44666	0,16484
ADAMTS13	0,208	-0,3481	0,7283	-0,5180	0,2398	-0,1699	1,0000
ADAMTS8	0,009	-1,1757	0,0060	-0,8561	0,1169	0,3195	1,0000
CD44	0,216	-0,2248	0,2517	-0,0479	1,0000	0,1769	0,6474
CDH1	0,005	-0,9864	0,0030	-0,4964	0,4645	0,4901	0,4855
CLEC3B	0,065	-0,3176	0,0809	-0,2138	0,4226	0,1038	1,0000
CNTN1	0,003	-0,8876	0,0030	-0,6697	0,0420	0,2180	1,0000
COL11A1	0,309	-0,0428	1,0000	0,1462	0,7193	0,1890	0,4226
COL12A1	0,435	-0,3973	0,5694	-0,2896	1,0000	0,1077	1,0000
COL14A1	0,804	-0,1405	1,0000	-0,0958	1,0000	0,0447	1,0000
COL15A1	0,020	0,2607	0,7193	0,5885	0,0180	0,3278	0,4825
COL16A1	0,307	0,0464	1,0000	-0,1488	0,7193	-0,1952	0,4376
COL1A1	0,009	-0,8389	0,0060	-0,4369	0,5215	0,4020	0,6803
COL4A2	0,002	0,4878	0,0450	0,6568	0,0030	0,1690	1,0000
COL5A1	0,633	-0,1052	1,0000	-0,1717	0,9920	-0,0665	1,0000
COL6A1	0,312	-0,1762	0,8272	-0,2361	0,4525	-0,0599	1,0000
COL6A2	0,394	-0,3581	0,5155	-0,0977	1,0000	0,2604	1,0000
COL7A1	0,177	-0,5203	0,4346	-0,6031	0,2757	-0,0827	1,0000
COL8A1	0,125	-0,7782	0,2817	-0,8592	0,2188	-0,0810	1,0000
CTGF	0,001	-1,2104	0,0030	-0,3230	1,0000	0,8874	0,0300
CTNNA1	0,066	-0,1533	0,3926	-0,2142	0,0659	-0,0609	1,0000
CTNNB1	0,322	0,0197	1,0000	0,1899	0,5125	0,1702	0,7163
CTNND1	0,137	-0,0894	1,0000	0,2959	0,3956	0,3853	0,1708
CTNND2	0,148	-3,9325	1,0000	-4,4321	0,1648	-0,4996	1,0000
ECM1	0,028	-0,2469	0,3596	-0,4004	0,0270	-0,1535	0,9770
FN1	0,678	-0,1092	1,0000	0,0700	1,0000	0,1792	1,0000
HAS1	0,001	-5,2618	0,0030	-3,4967	0,0330	1,7651	0,5874
ICAM1	0,002	-0,8540	0,0030	-0,1651	1,0000	0,6889	0,0330
ITGA1	0,001	-0,7059	0,0030	-0,1566	1,0000	0,5493	0,0360
ITGA2	0,002	-1,5357	0,0030	-1,2821	0,0150	0,2536	1,0000
ITGA3	0,965	-0,0730	1,0000	-0,0032	1,0000	0,0698	1,0000
ITGA4	0,138	-0,2510	0,1409	-0,1784	0,5155	0,0726	1,0000
ITGA5	0,028	-0,4805	0,0270	-0,4064	0,1379	0,0741	1,0000
ITGA6	0,040	-0,2807	0,2338	-0,3579	0,0360	-0,0772	1,0000
ITGA7	0,012	-0,9895	0,0629	-1,0482	0,0330	-0,0587	1,0000
ITGA8	0,323	0,3708	1,0000	0,6523	0,3986	0,2815	1,0000
ITGAL	0,125	-1,4401	0,3926	0,3687	1,0000	1,8088	0,1738
ITGAM	0,032	0,2165	0,9381	-0,3488	0,3656	-0,5653	0,0330
ITGAV	0,017	-0,3146	0,1079	-0,3689	0,0300	-0,0543	1,0000
ITGB1	0,012	-0,5817	0,0030	-0,2625	0,6234	0,3192	0,4316
ITGB2	0,002	-0,2919	0,0120	-0,2943	0,0060	-0,0023	1,0000
ITGB3	0,075	-0,6151	0,0809	-0,4511	0,3746	0,1640	1,0000
ITGB4	0,042	-1,0599	0,0749	-0,9179	0,1528	0,1420	1,0000
ITGB5	0,547	-0,1891	0,9201	0,0011	1,0000	0,1902	0,9830
KAL1	0,001	-1,6638	0,0030	-1,1425	0,0420	0,5213	0,8931
LAMA1	0,002	-1,8671	0,0030	-2,2270	0,0060	-0,3598	1,0000
LAMA2	0,115	-0,1257	1,0000	-0,2539	0,0959	-0,1282	0,9890
LAMA3	0,051	-0,4063	0,0330	-0,1976	0,8272	0,2087	0,8302

Genes	Valor de $p$ Global	PBS x sJUK		PBS x sCIB		sJUK x sCIB	
		LogFC	Valor de $p$	LogFC	Valor de $p$	LogFC	Valor de $p$
LAMB1	0,068	-0,5250	0,0989	-0,0137	1,0000	0,5113	0,1678
LAMB3	0,053	-0,3882	0,1199	-0,3661	0,1439	0,0220	1,0000
LAMC1	0,057	-0,1541	0,3087	-0,2168	0,0330	-0,0627	1,0000
MMP1	0,001	-1,1186	0,0030	-0,7538	0,0240	0,3648	0,6324
MMP10	0,023	-0,6038	0,0240	-0,2212	0,9980	0,3827	0,2997
MMP11	0,001	1,2151	0,0030	1,1541	0,0030	-0,0611	1,0000
MMP12	0,037	-0,7548	0,0210	-0,4109	0,5604	0,3439	0,8961
MMP13	0,074	-1,0919	1,0000	-9,1935	0,1169	-8,1015	0,9500
MMP14	0,203	-0,7422	0,2817	-0,6018	0,5604	0,1403	1,0000
MMP15	0,011	-2,3845	0,0240	-2,3645	0,0180	0,0200	1,0000
MMP16	0,014	-0,7496	0,0240	-0,5542	0,1499	0,1954	1,0000
MMP2	0,181	0,0362	1,0000	0,3397	0,3027	0,3035	0,4166
MMP3	0,002	-0,6487	0,1199	-1,0200	0,0030	-0,3713	0,8452
MMP7	0,244	-1,9512	0,7313	-1,9512	0,7313	-1,9512	0,7313
MMP8	1,001	8,0289	1,0000	8,5661	0,9830	0,5372	1,0000
MMP9	0,016	-0,5205	1,0000	-1,3432	0,2038	-0,8227	0,6414
NCAM1	0,929	0,0517	1,0000	0,0248	1,0000	-0,0270	1,0000
PECAM1	0,015	-2,4939	0,0240	-2,3821	0,0509	0,1118	1,0000
SELE	1,001	0,3361	1,0000	0,3361	1,0000	0,3361	1,0000
SELL	0,252	-1,8989	0,7552	-1,8989	0,7552	-1,8989	0,7552
SELP	0,052	-1,4861	0,0929	-1,3865	0,1588	0,0996	1,0000
SGCE	0,001	-0,2756	0,5395	-0,5601	0,0030	-0,2845	0,5395
SPARC	0,107	-0,3873	0,1079	-0,0942	1,0000	0,2931	0,4525
SPG7	0,405	-0,3816	0,5365	-0,2245	1,0000	0,1571	1,0000
SPP1	0,019	-0,3535	0,0120	-0,1082	1,0000	0,2452	0,2098
TGFBI	0,002	-0,5795	0,0030	-0,1278	1,0000	0,4517	0,0300
THBS1	0,001	-0,0069	1,0000	0,8121	0,0030	0,8190	0,0030
THBS2	0,004	-0,4107	0,0569	-0,5296	0,0060	-0,1190	1,0000
THBS3	0,230	-0,5194	0,2278	-0,2513	1,0000	0,2681	1,0000
TIMP1	0,023	0,4629	0,0240	0,3431	0,2308	-0,1198	1,0000
TIMP2	0,564	0,0428	1,0000	0,1981	0,9291	0,1553	1,0000
TIMP3	0,805	4,2907	1,0000	4,1217	1,0000	-0,1690	1,0000
TNC	0,049	0,4998	0,1019	0,5115	0,1109	0,0117	1,0000
VCAM1	0,001	-1,3164	0,0030	-0,9501	0,0150	0,3663	0,9231
VCAN	0,108	-0,5363	0,2547	-0,6015	0,1678	-0,0652	1,0000
VTN	0,016	-2,3514	0,0060	-1,4333	0,2547	0,9181	0,8212