Emanuela Avelar Silva Costa

Expressão de microRNAs em indivíduos com infecção assintomática e com mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa em Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Prof. Dr. Aluisio Augusto Cotrim Segurado
Co-orientadora: Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Emanuela Avelar Silva
Expressão de microRNAs em indivíduos com infecção assintomática e com mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) / Emanuela Avelar Silva Costa. -- São Paulo, 2016.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: Aluisio Augusto Cotrim Segurado.
Coorientadora: Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira.

Descritores: 1.Vírus 1 linfotrópico T humano 2. Paraparesia espástica tropical 3.Linfócitos T CD4-positivos 4.Linfócitos T CD8-positivos 5.MicroRNAs 6.Infecções por HTLV-1

USP/FM/DBD-291/16

Dedico este trabalho aos meus maiores mentores,

***Profa. Dra. Adele Caterino-de-Araújo** e **Prof. Dr. Aluisio Augusto Cotrim Segurado**.*

Com todo o meu carinho, respeito e gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus...

Agradeço ao Criador por essa conquista,
pelo dom da vida e por ter nos abençoado com a inteligência.

Aos meus pais, Socorro Avelar e Rosevaldo Costa...

Minha mãe... meu porto seguro... meu pai... meu pilar... Tudo é por vocês... Tudo é para vocês... Obrigado pela educação, minha maior herança... pelos valores, minhas maiores relíquias... por meus irmãos, meu maior laço com vocês. Perdoem a minha ausência durante tantos anos, mas não podia deixar para vocês, a responsabilidade de buscar a minha felicidade. Conforme prometi, tão logo, estarei por perto e dedicarei-me mais a vocês.

À Raphael Siqueira...

Agradeço a você, amor... Meu presente de Deus...
Pelo cuidado... pelo incentivo... pela confiança...
Por ter mudado a minha vida nos últimos meses...
Por ter me devolvido à vida!

E em especial, agradeço à ***Deise Pereira*** *pelo carinho com o qual me acolheu em sua Família... Obrigado pelo aconchego do seu colo e do seu lar!*

À Família Sacramento...

Gratidão... gratidão e gratidão! Agradeço a vocês por terem sido meus pais... por terem sido parte da minha Família nos últimos 13 anos... Jamais saberei como agradecê-los em palavras... Obrigado ***Iraci Sacramento*** *pela alegria contagiante... Obrigado* ***Raul Sacramento*** *pelos ensinamentos e generosidade... E a você,* ***Andrey Sacramento****, pela parceria, companheirismo e felicidade que me proporcionou durante muitos anos da minha vida... Agradeço, enfim, pela amizade que se eterniza.*

Ao meu orientador, Prof. Dr. Aluisio Segurado...

Redigir uma Tese de Doutorado... um grande desafio! Redigi-la como aluna do Prof. Aluisio... um grande prazer! Obrigado por tornar exequível a execução deste trabalho. Agradeço pelos últimos 4 anos de mavioso convívio... e de desmedido aprendizado. Obrigado por desvelar as fronteiras da ciência comigo, permitindo-me crecser... E, por fim, referenciando-o, agradeço por ampliar vastamente o meu vocabulário! É sempre um prazer aprender com o senhor. Seus exemplos, como pessoa e profissional, norteiam e norteiarão a minha conduta pessoal e acadêmica para sempre. Obrigado pelo sonho. Obrigado pela oportunidade. Obrigado pela concretização.

À minha co-orientadora, Drª Ludmila Ferreira...

Agradeço-lhe imensamente pela receptividade e pela leveza com a qual conduziu este complexo estudo co-orientando-me. Obrigado por ampliar os meus conhecimentos e por respeitar as minhas limitações. Obrigado por me estimular a investigar... justificar... a persistir. Enfim, obrigado por me mostrar o encantador mundo dos microRNAs.

À minha eterna orientadora, Drª Adele Caterino-de-Araújo...

A você, Adele, agradeço pela honra de ter lhe conhecido e ter feito parte do seu time... Você mudou os rumos da minha vida, pessoal e profissional. Apresentou-me o HTLV e eu, o adotei. Obrigado não só pelo crescimento profissional adquirido... mas também pelos valores transmitdos. Enfim, obrigado pela amizade.

Aos meus amigos...

À todos aqueles que me incentivaram e estiveram presentes em minha jornada, agradeço. Em especial, à ***Artemir Coelho de Brito****, meu fiel e grande amigo... O irmão que escolhi ter. Obrigado, meu amigo-irmão. Obrigado por me permitir desfrutar do verdadeiro sentido da palavra amizade.*

Aos membros da Banca do Exame de Qualificação ***Profa. Dra. Simone Kashima****,* ***Profa. Dra. Ileana Rubio*** *e* ***Prof. Dr. José Eduardo Levi*** *pelas relevantes sugestões que foram acatadas.*

À ***Dra. Maria Lourdes Farre Vallve****, Pesquisadora Científica e ao* ***Dr. Everton Batista****, colaborador da Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM/FIOCRUZ/BA) por terem, gentilmente, cedido linhagens celulares utilizadas na otimização de ensaios moleculares do atual estudo.*

Ao ***Prof. Dr. Douglas F. Nixon****, do Departmento de Microbiologia, Imunologia e Medicina Tropical da George Washington University e ao* ***Dr. Fábio Eudes Leal****, Pesquisador Científico da mesma Instituição, pela contribuição direta de etapas de execução deste trabalho. Em especial, agradeço a você Fábio, por toda assessoria científica prestada, confiança depositada e incentivo constante.*

Ao Laboratório de Investigação Médica em Imunologia Clínica e Alergia (LIM-60) do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sob responsabilidade do ***Prof. Dr. Esper Georges Kallás****, pela parceria e contribuição para a realização deste estudo. Em especial, agradeço à* ***Profa. Dra. Karina Carvalho*** *pela assistência científica prestada e à* ***Dra. Helena Tomiyama*** *e equipe por todo suporte técnico e logístico fornecido. Em especial, agradeço ao* ***Lucas Semeão****, à* ***Priscilla*** *e* ***Dayane Costa*** *por todo apoio, aprendizado e amizade em meio à execução deste trabalho.*

Ao Laboratório de Investigação Médica em Histocompatibilidade e Imunidade Celular (LIM-19), sob responsabilidade do ***Prof. Dr. Edecio Cunha-Neto****, pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial, agradeço à* ***Darlan Cândido*** *pela contribuição direta na execução do presente estudo e pelos ensinamentos compartilhados.*

Ao Laboratório de Investigação Médica em Virologia (LIM-52) sob responsabilidade do ***Dr. Cláudio Sérgio Pannuti****, em especial, à* ***Dra. Ester Sabino*** *e ao* ***Dr. Walter Kleine Neto*** *pelos estudos-piloto realizados. Agradeço também, a* ***Luciano Monteiro****, por todo o apoio técnico prestado.*

À todos os profissionais do Ambulatório de assistência a pessoas infectadas pelos vírus HTLV-1/2 da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP, em especial à ***Dra. Juliana Yamashiro*** *pela assistência clínica dada aos portadores de infecção por HTLV-1 e pacientes com mielopatia envolvidos neste estudo. Agradeço i-m-e-n-s-a-m-e-n-t-e à* ***Camila Picone****, pela sua doçura, carinho, amizade e competência. À* ***Marisa Nascimento*** *e* ***Célia Vieira*** *por todo suporte técnico. E um agradecimento mais do que especial,* ***aos pacientes****, proagonistas desta pesquisa, que voluntariamente, se "doaram" com um olhar de esperança, alguns dos quais, jamais esquecerei.*

Aos Funcionários do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias e da Casa da AIDS do HC-FMUSP que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento deste estudo. Em especial, agradeço à ***Ester Aquino****,* ***Delsa Nagata****,* ***Verônica Fortunato*** *e* ***Luisa Vieira*** *pela competência, profissionalismo e atenção a mim dispensadas.*

À equipe do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (PPG/DIP/FMUSP), em especial à ***Roseli Antonia Santo****, pela presteza, agilidade e profissionalismo de sempre.*

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS XI
LISTA DE FIGURAS XV
LISTA DE QUADROS XVIII
LISTA DE TABELAS XIX
RESUMO XX
ABSTRACT XXII
1. INTRODUÇÃO 24
1.1. Infecção por HTLV-1 24
1.2. Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) 28
1.3. microRNAs 32
1.4. Infecção por HTLV-1 e miRNAs 36
2. OBJETIVOS 43
3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS 44
3.1. Delineamento da pesquisa 44
3.2. Locais e período de realização do estudo 44
3.3. Seleção dos participantes do estudo 45
3.4. Procedimentos do estudo 47
3.4.1. Coleta de dados dos participantes 47
3.4.2. Coleta de amostras de sangue 48
3.4.3. Processamento das amostras 48
3.4.3.1. Obtenção de plasma 50
3.4.3.2. Obtenção de PBMCs 50
3.4.3.3. Descongelamento de PBMCs 50
3.4.3.4. Obtenção de linfócitos T CD4+ e T CD8+ 51
3.4.3.5. Avaliação da pureza das células isoladas 52
3.5. Extração de ácidos nucleicos a partir de PBMCs 53
3.5.1. Extração de DNA para detecção da carga proviral 53
3.5.2. Extração de RNA para detecção da expressão de genes virais 53

3.5.3. Extração de RNA total para detecção da expressão de microRNAs 53
3.5.4. Avaliação da pureza do RNA total isolado 54
3.6. Protocolo de investigação laboratorial 55
3.6.1. Leucograma e contagem de células T CD4+ e T CD8+ 55
3.6.2. Detecção de carga proviral de HTLV-1 por qPCR 58
3.6.3. Detecção da expressão de *tax* e *HBZ* de HTLV-1 62
3.6.4. Quantificação da expressão de miRNAs conhecidos 65
3.6.4.1. Seleção das amostras e extração de RNA total 65
3.6.4.2. Transcrição reversa (RT) 67
3.6.4.3. Detecção da expressão de microRNAs por *TLDA* 68
3.6.4.4. Ferramentas estatísticas para análise dos resultados 72
3.6.4.5. Análise ROC 72
3.6.4.6. Análises bioinformáticas 73
3.7. Aspectos éticos 75
4. RESULTADOS 76
4.1. Caracterização da população de estudo 76
4.2. Contagem e avaliação da pureza das células T CD4+ e T CD8+ 78
4.3. Quantificação da carga proviral de HTLV-1 79
4.4. Determinação da expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* 81
4.5. Determinação da expressão relativa de microRNAs 85
4.5.1. Seleção das amostras e extração de RNA 85
4.5.2. Perfil de expressão de miRNAs em células T CD4+ e T CD8+ em indivíduos infectados por HTLV-1 85
4.5.3. Análises de bioinformática 97
4.5.3.1. Predição de RNAm alvos 97
4.5.3.2. Vias canônicas significativamente associadas aos miRNAs desregulados e seus alvos preditos no grupo HAM, quando comparados aos ASS 106
4.5.3.3. Análise detalhada das redes gênicas afetadas por microRNAs desregulados no grupo HAM em comparação com o grupo ASS 108

4.5.4. Análise da correlação entre os miRNAs desregulados no grupo HAM comparados ao grupo ASS com a carga proviral e e expressão dos genes virais (*tax* e *HBZ*) 123
4.5.5. Avaliação de intensidades de expressão de microRNAs específicos como potenciais biomarcadores para diferenciação entre estado de portador assintomático de infecção por HTLV-1 e HAM/TSP 127
5. DISCUSSÃO 131
6. CONCLUSÃO 148
ANEXO 150
REFERÊNCIAS 166

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC	área sob a curva
ADAM 10	*ADAM metallopeptidase domain 10*
AKAP	PKAr + *Pka catalytic subunit*
AKT1	*AKT serine/threonine kinase 1*
AP-1	fator de transcrição AP-1
APC	aloficocianina
APC-Cy7	aloficocianina com cianina 7
ARE-BP	proteínas adenina/uridina
ASS_A	grupo de portadores assintomáticos de infecção por HTLV-1 com carga proviral alta
ASS_B	grupo de portadores assintomáticos de infecção por HTLV-1 com carga proviral baixa
ATF-1	*activating transcription factor 1*
ATL	leucemia de céulas T do adulto
ATP/cAMP	*adenosine triphosphate/3'5'-cyclic adenosine monophosphate*
AZI2	*AZI2 5-azacytidine induced 2*
BAD	*Bcl-2-associated death promoter*
BSA	albumina sérica bovina
CD	*cluster of differentiation*
CDC42	*cell division cycle 42*
cDNA	DNA complementar
CHUK	*conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase*
CN	grupo controle
CPV	carga proviral
CREB	*cAMP-responsive element binding protein*
CREM	*cAMP-responsive element modulator*
CTL	célula T citotóxica CD8+
CTNNB1	*catenin beta-1*
CXCR4	*C-X-C motif chemokine receptor 4*
DMSO	dimetilsulfóxido

E2F1	fator de transcrição E2F1
EBI3	*interleukin-27 subunit beta precursor*
EGF	*epidermal growth factor*
EGFR	*epidermal growth factor receptor*
ELISA	ensaio imunoenzimático
ELK4	*ETS-domain protein SRF accessory protein*
ENFB/ENFA	*EPH receptor B1* e *A1*
ERK5	*extracellular-signal-regulated kinase 5*
FBS	soro fetal bovino
FDR	*False Discovery Rate*
FGF1	*FGF1 fibroblast growth factor 1*
FITC	isotiocianato fluorosceína
FOSL1	*FOS like 1, AP-1 transcription factor subunit*
FOXO3	*Forkhead box protein O3*
FSC	*forward scatter*
GNA13	*G protein subunit alpha 13*
GTP	*cyclohydrolase I*
GSK3B	*Glycogen synthase kinase 3 beta*),
HAM_A	grupo de pacientes com HAM/TSP com carga proviral alta
HAM_B	grupo de pacientes com HAM/TSP com carga proviral baixa
HAM/TSP	Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical
HBZ	Fator de zíper de leucina básico do HTLV-1
HBZ-SI	Isoforma de HBZ
HBV	vírus da hepatite B
HCV	vírus da hepatite C
HHV-8	herpes vírus humano tipo 8
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HLA	antígeno leucocitário humano
hnRNP-A1	proteína ribonucleica heterogênea A1
HTLV	vírus linfotrópico de células T humanas
hsa	*Homo sapiens*
hsa-miR	microRNA humano

IFN-γ	interferon-gama
IKB/NFkB	*IkB kinase/nuclear transcription factor kappa B*
IL	interleucina
IL6ST	*interleukin 6 signal transducer*
IKB	*Ingenuity Knowledge Base*
IPA	*Ingenuity Pathway Analysis*
IRAK3	quinase associada ao receptor de IL-3
IRAK6	quinase associada ao receptor de IL-6
JAK2	*janus kinase 2*
LIF	*leukemia inhibitory factor*
LNA	*Locked Nucleic Acid*
LTR	segmentos terminais longos repetitivos
Mfe	energia livre
MAP2K5	*mitogen-activated protein kinase 5*
MAP3K1	*MAP3K1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*
miRNA	microRNA
mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NAT	técnica de amplificação de ácido nucléico
NGF	*Nerve Growth Factor*
NF-κb	fator nuclear kappa b
NGS	sequenciamento de nova geração
NTRK2	*neurotrophic receptor tyrosine kinase 2*
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	fase aberta de leitura
PDE	familia das fosfodiesterases
PKA	*Protein Kinase A*
PBMC	células mononucleares do sangue periférico
PBS	tampão fosfato/salina
PE	ficoeritrina
PFA	paraformaldeído
PI3K	*phosphoinositide 3-kinase*

PPP	Família das fosfatases
PPPR1B	*protein phosphatase 1, regulatory subunit 1B*
PTEN	gene supressor de tumores PTEN
PTK2	*PTK2 protein tyrosine kinase 2*
PTPN11	*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*
qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
RAC1	*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 precursor*
RASA1	*RAS p21 protein activator 1*
RB2	*retinoblastoma-related gene*
RelA/NK-kB	*p65 heterodimere NK-kB*
RGS3	*RGS3 regulator of G-protein signaling 3*
RHOA	*ras homolog family member A*
RNAi	RNA de interferência
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
ROC	*Receiver Operating Characteristic*
rpm	rotações por minuto
RTK/RTK	*receptor tyrosine kinase*
RQ	Quantificação relativa
SMAD5	fator de transcrição SMAD 5
SSC	*side scatter*
STAT3; 5	transdutores de sinal e ativadores da transcrição 3; 5
TACR1	*tachykinin precursor receptor 1*
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF-β	fator de transformação de crescimento - beta
TGFBR1	*TGF-βeta receptor type-1 precursors*
TGFBR2	*TGF-βeta receptor type-2 precursors*
TLDA	*TaqMan® Low Density MicroRNA Array*
TNF-α; -β	fator de necrose tumoral-alfa; -beta
TNFAIP3	*TNF alpha induced protein 3*
TP53INP1	proteína supressora de tumor induzido por p53
TRAF6	*TNF receptor associated factor 6*
UTR	região não traduzida
WNK1	*WNK lysine deficient protein kinase 1*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática da teoria da patogênese da HAM/TSP denominada "*Bystander damage*" 29

Figura 2 Representação esquemática da teoria da patogênese da HAM/TSP denominada Autoimunidade 30

Figura 3 Representação esquemática da teoria da patogênese da HAM/TSP denominada Toxicidade direta 31

Figura 4 Biogênese de miRNAs e suas vias regulatórias 34

Figura 5 Fluxograma da estratégia experimental adotada no presente estudo 49

Figura 6 Estratégia de análise utilizada no painel de citometria de fluxo de linfócitos T em amostra de PBMC de indivíduos sadios, portadores assintomáticos de HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP 57

Figura 7 Estratégia adotada para a seleção de amostras submetidas à qPCR para detecção da expressão de miRNAs 66

Figura 8 Representação esquemática do Painel *TLDA A* destacando miRNAs desregulados detectados em amostras de infectados por HTLV-1 reportados previamente na literatura 70

Figura 9 Representação esquemática do Painel *TLDA B* destacando miRNAs desregulados detectados em amostras de infectados por HTLV-1 reportados previamente na literatura 71

Figura 10 Caracterização linfocitária dos grupos controle, portadores assintomáticos e pacientes com HAM/TSP .. 79

Figura 11 Distribuição da carga proviral entre os indivíduos assintomáticos e com HAM/TSP 80

Figura 12 Distribuição do número de amostras que expressaram *tax* e/ou *HBZ* de HTLV-1 entre os indivíduos infectados por HTLV-1 81
Figura 13 Expressão de *tax* e *HBZ* normalizadas com DNA proviral de HTLV-1 83
Figura 14 Expressão dos RNAm *tax* e *HBZ* normalizada por DNA proviral de HTLV-1 nas amostras que expressaram ambos os genes 84
Figura 15 *Volcano plot* da expressão relativa de miRNAs detectados em células T CD4+ e T CD8+ de portadores assintomáticos de HTLV-1 e de pacientes com HAM/TSP por RT-qPCR 90
Figura 16 Comparação da expressão relativa dos miRNAs desregulados nos pacientes com HAM/TSP 92
Figura 17 *RQ box plots* da expressão relativa dos miRNAs diferenciais detectados em células T CD4+ e T CD8+ de pacientes com HAM/TSP em comparação com o grupo de portadores assintomáticos 92
Figura 18 Diagrama de Venn dos microRNAs desregulados identificados nos grupos ASS e HAM 94
Figura 19 *RQ box plots* da expressão relativa dos três miRNAs diferenciais simultaneamente expressos em células T CD4+ e T CD8+ nos grupos HAM e ASS 95
Figura 20 Agrupamento hierárquico não supervisionado do perfil de expressão de microRNAs nos grupos CN, ASS e HAM 96
Figura 21 Distribuição das redes gênicas identificadas pelo IPA como potencialmente afetadas pelos miRNAs desregulados no grupo HAM, quando comparado ao grupo ASS 106
Figura 22 Percentual de moléculas nodais e as suas respectivas vias que estão relacionadas aos miRNAs desregulados no grupo HAM, quando comparado ao grupo ASS 107

Figura 23 Representação gráfica da via canônica da *ERK5*, incluindo as moléculas nodais relacionadas aos microRNAs diferencialmente expressos detectados no grupo HAM no presente estudo 110
Figura 24 Representação gráfica da via canônica da *Protein Kinase A*, incluindo as moléculas nodais relacionadas aos microRNAs diferencialmente expressos detectados no grupo HAM no presente estudo 113
Figura 25 Representação gráfica da via canônica da NF-κb, incluindo as moléculas nodais relacionadas aos microRNAs diferencialmente expressos detectados no grupo HAM no presente estudo 115
Figura 26 Representação gráfica da via canônica da NGF, incluindo as moléculas nodais relacionadas aos microRNAs diferencialmente expressos detectados no grupo HAM no presente estudo 117
Figura 27 Representação gráfica da via canônica da *Ephrin Receptor*, incluindo as moléculas nodais relacionadas aos microRNAs diferencialmente expressos detectados no grupo HAM no presente estudo 120
Figura 28 Representação gráfica da via canônica da *Neuropathic Pain Signaling In Neurons*, incluindo as moléculas nodais relacionadas aos microRNAs diferencialmente expressos detectados no grupo HAM no presente estudo 122
Figura 29 Curva ROC com os microRNAs selecionados para avaliação da distinção de portadores assintomáticos de infecção por HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP 127
Figura 30 Representação gráfica da rede da HAM/TSP, incluindo as moléculas nodais mais relacionadas aos microRNAs diferencialmente expressos detectados no presente estudo 130

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 MicroRNAs desregulados detectados em linhagens celulares infectadas por HTLV-1 e em amostras de pacientes com HAM/TSP e ATL 39

Quadro 2 Critérios diagnósticos da OMS para definir HAM/TSP 46

Quadro 3 Níveis de verificação para critérios diagnósticos da HAM/TSP 47

Quadro 4 Definição dos títulos dos anticorpos utilizados na contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+ 56

Quadro 5 *Primers* e sonda utilizados nas reações de PCR em tempo real (albumina humana e *pol*) para a detecção de DNA endógeno e proviral de HTLV-1 59

Quadro 6 Protocolo adotado nas reações de PCR em tempo real (*tax* e albumina) para a identificação dos respectivos segmentos genômicos, humano e do HTLV-1 60

Quadro 7 *Primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real (*tax*, *HBZ* e *HPRT*) para a determinação de seus respectivos RNAm 63

Quadro 8 Protocolo adotado nas reações de PCR em tempo real (*tax*, *HBZ* e *HPRT*) para a identificação dos respectivos segmentos genômicos do HTLV-1 e humano 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Caracterização demográfica dos indivíduos sadios e infectados pelo HTLV-1 em relação ao sexo e idade 77

Tabela 2 Análise da correlação a expressão de RNAm Tax, RNAm HBZ e carga proviral de HTLV-1 em portadores assintomáticos e pacientes com HAM/TSP 82

Tabela 3 Expressão relativa (*fold-change*) de miRNAs isolados de células T CD4+ e T CD8+ do grupo HAM, quando comparada à do grupo ASS 87

Tabela 4 Expressão relativa (*fold-change*) de miRNAs isolados de células T CD4+ e T CD8+ do grupo ASS, quando comparada à do grupo CN 88

Tabela 5 Expressão relativa (*fold-change*) de miRNAs isolados de células T CD4+ e T CD8+ do grupo HAM, quando comparada à do grupo CN 89

Tabela 6 Número de RNAm identificados na análise *in silico* como alvos preditos associados aos miRNAs diferencialmente expressos no grupo HAM (*vs.* ASS) 98

Tabela 7 Número de RNAm identificados na análise *in silico* como alvos preditos associados aos miRNAs diferencialmente expressos no grupo ASS (*vs.* CN) 99

Tabela 8 Número de RNAm identificados na análise *in silico* como alvos preditos associados aos miRNAs diferencialmente expressos no grupo HAM (*vs.* CN) 101

Tabela 9 Redes gênicas com os 10 escores mais altos obtidas do IPA, geradas com base na expressão de miRNAs desregulados no grupo HAM quando comparado ao grupo ASS 103

Tabela 10 Correlação da expressão de microRNAs com a carga proviral de HTLV-1 125

Tabela 11 Correlação da expressão de microRNAs com a expressão de RNAm Tax e RNAm HBZ de HTLV-1 126

RESUMO

COSTA EAS. *Expressão de microRNAs em indivíduos com infecção assintomática e com mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical* (HAM/TSP) [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Embora o vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) seja reconhecido como o agente etiológico da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) e da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP), cerca de 90% dos indivíduos infectados permanecem assintomáticos por toda a vida. Até o presente momento, os fatores associados ao desenvolvimento de doença relacionada ao HTLV-1 não foram totalmente elucidados. Sabe-se que o aumento da carga proviral e a expressão de genes virais estão envolvidos no desenvolvimento/progressão de doenças associadas ao HTLV-1. Assim, por exemplo, a proteína Tax modula genes envolvidos na patogênese da HAM/TSP e genes regulados por HBZ estimulam a proliferação de linfócitos T, induzindo a ATL. Desde a última década, diversos estudos têm demonstrado que células transformadas pelo HTLV-1 apresentam microRNAs do hospedeiro desregulados, o que poderia promover alteração na expressão de genes virais (*tax* e *HBZ*), com possível contribuição para o desenvolvimento de HAM/TSP e ATL. Diante desses indícios, o presente estudo teve como objetivos: i) quantificar a expressão de miRNAs humanos conhecidos em células T CD4+ e T CD8+ do sangue periférico de indivíduos assintomáticos infectados por HTLV-1 e de pacientes com HAM/TSP; ii) identificar padrões diferenciais de expressão de miRNAs desregulados que pudessem caracterizar os grupos de pacientes de acordo com sua condição clínica; iii) investigar associações dos padrões diferenciais de expressão de miRNAs com a carga proviral e com a expressão dos genes tax e HBZ de HTLV-1. Analisou-se o perfil de expressão de 754 miRNAs em células T CD4+ e TCD8+ infectadas por HTLV-1 em 19 indivíduos assintomáticos, 17 pacientes com HAM/TSP e 14 controles não infectados.

Foram detectados 10 miRNAs diferencialmente expressos no grupo HAM, quando comparados ao grupo ASS (super-expressos: hsa-miR-133a, -148a, -211, -330, -369-5p, -486 e -889 e sub-expressos: hsa-miR-520b, -520e e -566). A expressão alterada dos hsa-miR-133a, -148a, -211, e -889 (super-expressos) e do hsa-miR-520b (sub-expresso) foi correlacionada à carga proviral e a do hsa-miR-211 (super-expresso) à expressão de *tax*. Além disso, ao analisar as vias canônicas geradas no estudo, identificaram-se as moléculas IL6ST, PTPN11, MAP2K5, ELK4, AKT1, BAD, FOSL1, IRAK 3, CDC42, STAT3 e CREB A como potencialmente afetadas pela expressão alterada de miRNAs no grupo HAM, quando comparado com o grupo ASS. Tais achados mostram-se úteis para o delineamento futuro de estudos longitudinais com indivíduos infectados por HTLV-1, com vistas à identificação de biomarcadores prognósticos de risco para o desenvolvimento de HAM/TSP.

Descritores. Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1; Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical; Linfócitos T CD4-positivos; Linfócitos T CD8-positivos; microRNAs, Infecções por HTLV-1.

ABSTRACT

COSTA EAS. *MicroRNA expression in HTLV-1 asymptomatic carriers and in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Even though human lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is etiologically linked to adult T-cell leukemia (ATL) and to HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), about 90% of infected individuals remain asymptomatic lifelong. So far, factors that are associated with development of HTLV-1-related disease have not been totally clarified. Increase in proviral load and expression of viral genes are recognized as involved in disease development and progression. For instance, the Tax protein is known to modulate genes that are involved in HAM/TSP pathogenesis and HBZ-regulated genes account for T lymphocyte proliferation that leads to ATL. In the last decade, several studies have shown that HTLV-1-transformed cells exhibit dysregulated human microRNA expression, which could result in altered viral gene expression (*tax* and *HBZ*), contributing to the development of HAM/TSP and ATL. Based on this evidence, our study aimed at: i) quantifying known human miRNA expression in CD4+ and CD8+ peripheral blood T-cells from HTLV-1 asymptomatic carriers and patients with HAM/TSP; ii) identifying distinctive dysregulated miRNA expression profiles that could distinguish patients according to their clinical status; iii) investigating associations between differential miRNA expression profiles with proviral load and with HTLV-1 *tax* and HBZ gene expression. We analysed the expression profile of 754 miRNAs in CD4+ e CD8+ peripheral blood T cells from 19 HTLV-1 asymptomatic carriers (AC), 17 patients with HAM/TSP (HAM) and in 14 non-infected controls. Ten differentially expressed miRNAs were found in HAM, as compared with AC (overexpressed: hsa-miR-133a, -148a, -211, -330, -369-5p, -486 and -889; and underexpressed: hsa-miR-520b, -520e and -566). Altered

expression of hsa-miR-133a, -148a, -211, and -889 (overexpressed) and of hsa-miR-520b (underexpressed) was shown to be correlated with proviral load and that of hsa-miR-211 (overexpressed) with *tax* expression. Moreover, analysing the miRNA canonical pathways generated in this study, we identified IL6ST, PTPN11, MAP2K5, ELK4, AKT1, BAD, FOSL1, IRAK 3, CDC42, STAT3 and CREB A as molecules that are potentially affected by altered miRNA expression in HAM, as compared to AC. Our findings are useful for the future design of longitudinal studies of HTLV-1 infected cohorts, aiming at the recognition of prognostic biomarkers of risk for the development of HAM/TSP.

Descriptors. Human lymphotropic vírus type 1; HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic pararesis; CD4+ T lymphocytes; CD8+ T lymphocytes; microRNAs, HTLV-I infections.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infecção por HTLV-1

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus a ser associado com tumores malignos em humanos, sendo o agente causador da leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) e da doença neurodegenerativa paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP) (Poiesz et al., 1980; Yoshida et al., 1982; Osame et al., 1987).

No mundo, estima-se que 10 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1, sendo que o Brasil desponta como o país que apresenta o maior número absoluto de indivíduos soropositivos, com cerca de 2,5 milhões de pessoas infectadas (Proietti, 2015). Apesar da grande maioria permanecer assintomática por toda a vida (95-98%), calcula-se que de 1-4% dos indivíduos infectados desenvolvem HAM/TSP e 2-5% a ATL (Gessain e Cassar, 2012). Contudo, considerando as demais desordens neurológicas, doenças inflamatórias e manifestações dermatológicas que os indivíduos com essa infecção retroviral podem vir a desenvolver, estudos têm demonstrado que aproximadamente 10% dos infectados podem evoluir com alguma das manifestações clínicas anteriormente citadas (de Oliveira et al., 2005; Ratsan-Pinheiro et al., 2009; Desdouits et al., 2013).

A HAM/TSP apresenta-se com sintomas neuroinflamatórios e evolui para o desenvolvimento de paresia espástica, principalmente em membros inferiores, em função da resposta imunológica do hospedeiro a proteínas virais (Yasunaga e Matsuoka, 2011). Já na ATL, a neoplasia maligna desenvolve-se por transformação celular induzida pelo vírus, sendo em geral, uma leucemia de células T de curso agressivo e altamente resistente à quimioterapia (Tsukasaki et al., 2009).

Os fatores que determinam o desenvolvimento dos diferentes desfechos clínicos associados à infecção por HTLV-1 ainda não foram totalmente elucidados. Estudos sugerem que podem influenciar nos possíveis eventos decorrentes da infecção: i) carga proviral (CPV) elevada em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (Sasaki et al., 2010); ii) o tipo e a magnitude da resposta imunológica do hospedeiro contra antígenos do HTLV-1 (Vine et al., 2004); e por fim, iii) fatores genéticos do vírus/hospedeiro, que incluem polimorfismos em genes relacionados à produção de interleucinas (Gadelha et al., 2008) e alterações na expressão de genes virais (Andrade et al., 2012) e de microRNAs humanos (sub- ou superexpressos) (Sampey et al., 2012; Moles e Nicot, 2015).

O HTLV-1, tal como outros retrovírus, utiliza a maquinaria celular do hospedeiro para completar seu ciclo replicativo e se propagar. O vírus tem infectam, preferencialmente, células T da subpopulação CD4+, embora células dendríticas, linfócitos B e macrófagos também possam ser infectados (Koyanagi et al., 1993). Durante a infecção, o HTLV-1 se integra ao genoma da célula hospedeira, recebendo nessa forma, a denominação de provírus

(Hall et al., 1994). Ao ser infectado, o linfócito tem suas vias de ativação e morte celular alteradas pela incorporação do material genético do vírus, passando também a expressar proteínas virais (Franchini, 1995).

O genoma proviral do HTLV-1 é composto por 9.032 pares de bases (Seiki et al., 1983), contendo genes estruturais comuns aos demais retrovírus (*env*, *gag* e *pol*) e genes regulatórios (*tax* e *rex*) localizados numa região próxima à extremidade 3', denominada *pX.* Nessa região é produzido um RNA mensageiro (RNAm) com quatro regiões abertas para leitura (ORFs), que codifica seis proteínas, entre elas, as proteínas Tax e Rex. Em suas extremidades 5' e 3', o genoma proviral apresenta as regiões denominadas *long terminal repeats* (LTR), cujas sequências são essenciais para a integração do DNA proviral no DNA cromossômico do hospedeiro e para a regulação transcricional do genoma viral (Shimotohno et al., 1985; Bartoe et al., 2000).

Na última década, a proteína denominada fator de zíper de leucina básico do HTLV-1 (HBZ) foi descrita, sendo a ela atribuída a função de suprimir a transativação mediada por Tax, quando da sua codificação a partir do promotor 3' LTR na fita negativa do provírus (Gaudray et al., 2002). Dessa forma, o HBZ transcreve-se em sentido contrário aos outros genes virais, sendo funcional em duas isoformas moleculares, RNA (HBZ-SI) e proteína (HBZ), o que poderia representar uma estratégia para regular a replicação viral e a proliferação de células T infectadas (Mesnard et al., 2006).

Das proteínas regulatórias do HTLV-1, Tax e HBZ têm papel de destaque na patogênese da HAM/TSP e ATL. O gene *tax* é considerado o

principal indutor das etapas iniciais da patogênese viral, uma vez que modula a expressão de genes virais e do hospedeiro (Yoshida, 2001; Boxus et al., 2008). Devido à sua atividade pleiotrópica, além de ativar a síntese de RNA proviral pela interação com fatores de transcrição e proteínas de remodelagem de cromatina, Tax também inibe a atividade de proteínas reguladoras do ciclo celular, o que estimula a proliferação de linfócitos infectados, inibe a apoptose e imortaliza células T (Kannagi et al., 1991; Asquith e Bangham, 2008). Diversos estudos têm mostrado que a expressão do gene *tax* na HAM/TSP transativa genes celulares codificadores de várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Assim, as células T infectadas que transpõem a barreira hemato-encefálica e alcançam o sistema nervoso central, ali desencadeiam a resposta inflamatória imunopatogênica, especialmente na região torácica da medula espinhal, principal sede do dano neurológico (Grant et al., 2002). Além disso, como a proteína Tax também se localiza na membrana celular, durante a resposta imunológica contra o HTLV-1, sua expressão na superfície de células infectadas a torna o principal alvo antigênico das células T CD8+ citotóxicas, fazendo com que a expressão aumentada desse gene seja um fator prognóstico para o desenvolvimento da HAM/TSP (Kannagi et al., 1991; Yamano et al., 2002).

Diferentemente, na ATL a expressão do gene *HBZ* ocorre de modo uniforme nas células infectadas, o que inibe diversos fatores de transcrição viral, inclusive a Tax. Uma vez que Tax é o antígeno viral imunodominante, a inibição da sua expressão dificulta o seu reconhecimento pelas células T CD8+, acarretando inibição da apoptose e, consequentemente favorecendo a

persistência viral. Ao lado disso, HBZ estimula a proliferação de linfócitos T, contribuindo para o desenvolvimento de células leucêmicas. Contudo, até o momento, não se conhecem com exatidão todos os passos intermediários que se seguem à proliferação de linfócitos infectados e a persistência viral, culminando na ocorrência de ATL (Matsuoka e Green, 2009; Satou e Matsuoka, 2012).

1.2. Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical (HAM/TSP)

A HAM/TSP é uma doença desmielinizante crônica e progressiva que acomete a medula espinhal e a substância branca do sistema nervoso central em alguns indivíduos infectados pelo HTLV-1 (Osame et al., 1987). O quadro, de início insidioso e, em geral, assimétrico, de fraqueza muscular proximal de membros inferiores é frequentemente associado a espasticidade muscular, alterações esfincterianas e sensoriais variáveis. O quadro clínico se inicia mais frequentemente após a quinta década de vida. Em um período que varia de meses a anos, surgem outros sintomas que compõem a síndrome, como fraqueza muscular em membros inferiores e a espasticidade que resulta em alterações de marcha e alterações sensoriais.

A patogênese da doença está associada ao processo inflamatório no sistema nervoso central relacionado à resposta imune ao HTLV-1. Os mecanismos mais aceitos são mostrados a seguir. As células T CD8+ HTLV-1-específicas migram através da barreira hemato-encefálica, saindo do sangue periférico e alcançando o sistema nervoso central, onde reconhecem

células T CD4+ infectadas pelo HTLV-1 que expressam antígenos virais. Tal reconhecimento pelas células T CD8+ HTLV-1-específicas desencadeia uma resposta imune que resulta na lise das células infectadas e na produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, tais como o IFN-γ (Interferon gama) e o TNF-α (Fator de necrose tumoral-alfa). Essas moléculas, por sua vez, podem exercer ação tóxica sobre as células gliais (micróglia e astrócitos), cuja lise acarreta dano ao tecido nervoso, tendo em conta a ação trófica que possuem sobre os neurônios (**Figura 1)**.

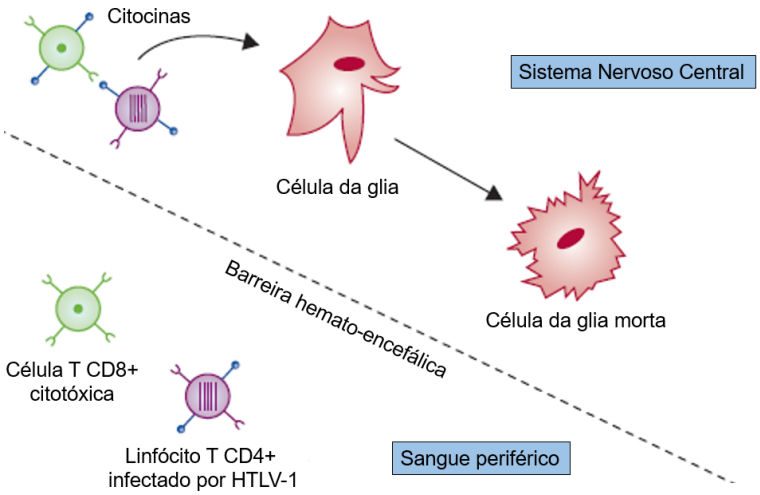


Figura 1. Representação esquemática da teoria da patogênese da HAM/TSP denominada "*Bystander damage*".

Fonte. Modificado de Araujo e Silva (2006).

Além desse modelo, é postulado que anticorpos anti-Tax apresentam capacidade de reatividade cruzada com autoantígenos de células do sistema nervoso central. Assim, por mimetismo molecular (Levin et al., 2002), tais anticorpos, ao interagirem com a proteína ribonucleica heterogênea A1 (hnRNP-A1), molécula que desempenha importante papel no transporte de

mRNA do núcleo para o citoplasma de neurônios, induzem dano neurológico por reação inflamatória neuronal e consequentemente desmielinização em pacientes com HAM/TSP (**Figura 2**).

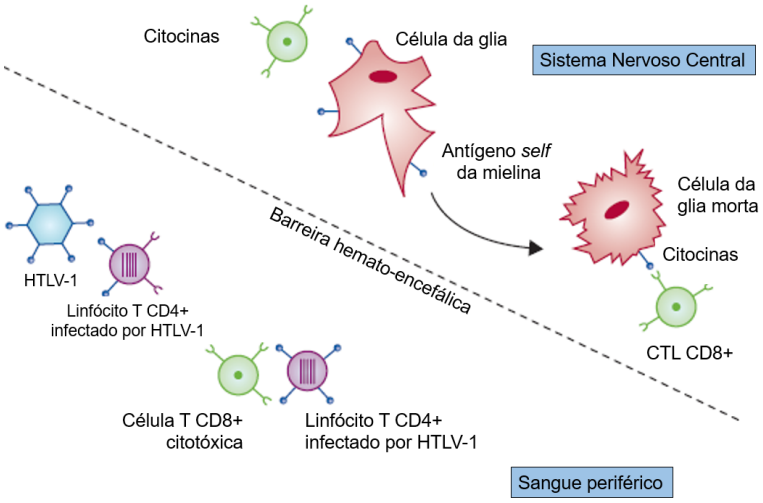


Figura 2. Representação esquemática da teoria da patogênese da HAM/TSP denominada Autoimunidade.

Fonte. Modificado de Araujo e Silva (2006).

Por fim, especula-se a possibilidade da patogênese da HAM/TSP poder igualmente advir de citotoxicidade direta mediada por células T CD8+ HTLV-1-específicas sobre células gliais infectadas por esse retrovírus (**Figura 3**).

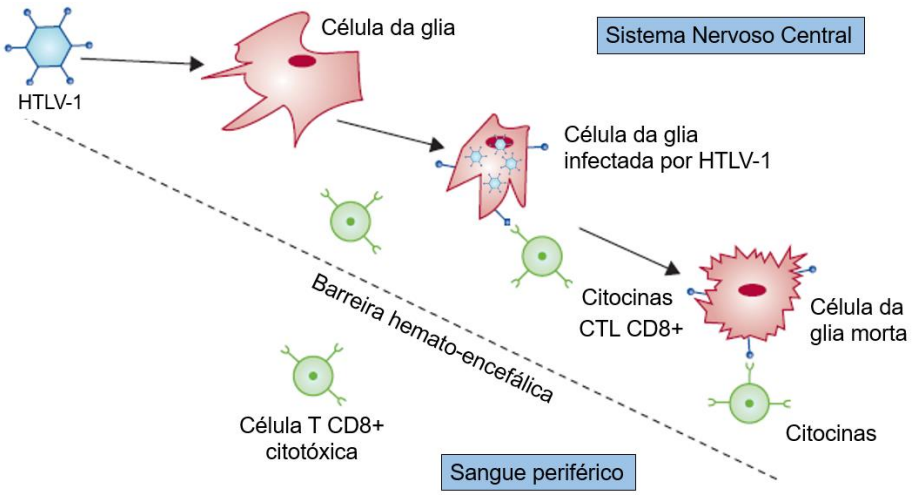


Figura 3. Representação esquemática da teoria da patogênese da HAM/TSP denominada Toxicidade direta.

Fonte. Modificado de Araujo e Silva (2006).

O processo inflamatório que ocorre na HAM/TSP está diretamente relacionado à expressão da proteína Tax, que provoca diversos efeitos sobre as células infectadas. Dentre as suas principais ações, destacam-se a ativação do fator nuclear NF-κb e subsequente estímulo de proliferação e ativação celulares (Cross et al., 1987), com aumento da produção de IL-2. Outras citocinas pró-inflamatórias como IL-15, TNF-α e IFN-γ também têm sua produção estimulada pela ação de Tax e parecem contribuir para o ambiente pró-inflamatório identificado em amostras de sangue periférico e sistema nervoso central de pacientes HAM/TSP (Azimi et al., 1998).

Embora nas últimas décadas a patogênese das doenças associadas à infecção por HTLV-1 venha sendo progressivamente elucidada, a carência de biomarcadores prognósticos validados têm dificultado consideravelmente o aconselhamento e o seguimento clínico dos portadores assintomáticos

dessa infecção, bem como a tomada precoce de decisões terapêuticas para esses indivíduos.

Uma vez descoberto o papel de microRNAs (miRNAs) na regulação da expressão gênica em animais, vírus, e até, em plantas (Jones-Rhoades et al., 2006; Houzet e Jeang, 2011), mais recentemente, diversos pesquisadores têm buscado avaliar o papel do miRNAs na gênese de diversas doenças.

1.3. microRNAs

MicroRNAs são sequências curtas de RNAs não codificantes, cujo comprimento varia de 19 a 25 ribonucleotídeos, e que atuam basicamente na regulação da expressão gênica. Seus alvos são RNAm, aos quais se ligam na região 3’ não traduzida (3’ UTR) para degradá-lo ou para silenciar a tradução de proteínas, geralmente aquelas envolvidas na resposta imunológica e em processos de diferenciação e proliferação celular (Hammond et al., 2001).

A descoberta dos miRNAs como inibidores pós-transcricionais ocorreu há duas décadas, durante o estudo de uma mutação em um gene responsável pelo desenvolvimento do nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Pesquisadores americanos demonstraram que, curiosamente, o gene mutado *lin-4* não codificava proteína alguma, mas expressava um pequeno RNA de aproximadamente 22 nt (Lee et al.,1993). A hipótese inicial era de que essas sequências curtas estariam presentes nesses parasitas e seriam as responsáveis pelo complexo processo de crescimento larval (Pasquinelli et al., 2000).

Por falta de métodos sensíveis o bastante para a sua detecção e também pela teoria de que todo DNA que não codifica proteína era considerado “DNA lixo”, até 1998, os miRNAs permaneceram até então despercebidos. Nesse ano, seria desvendado o mecanismo celular de interferência de RNA (RNAi), que descreve a maquinaria usada pelos miRNAs para o silenciamento da tradução de proteínas (Fire et al., 1998).

Com o advento de novas tecnologias e otimização de métodos convencionais em biologia molecular, o *microarray*, o sequenciamento de nova geração (NGS) e as novas ferramentas de bioinformática permitiram importantes descobertas. Estudos de transcriptomas revelaram que miRNAs exercem papel crucial na regulação gênica, sendo expressos em quase todos os seres eucariotos (Zamore e Haley, 2005) e até, em alguns vírus, como o herpes vírus humano tipo 8 (HHV-8) (Pfeffer et al., 2005) e o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (Omoto e Fujii, 2005), que codificam seus próprios miRNAs.

Até o momento, mais de 35.000 miRNAs maduros de 220 espécies já foram depositadas no banco de dados miRBase, e cerca de 1800 foram identificados em humanos (miRBase 21, 2014). Os miRNAs são evolutivamente conservados e são transcritos a partir de íntrons, éxons e regiões intergênicas. Embora localizados em regiões variadas do genoma, muitos miRNAs são comumente expressos (Griffiths-Jones et al., 2011). Outros têm sido identificados como tecido-específicos, dentre eles o hsa-miR-208a, que, em geral, encontra-se superexpresso em células cardíacas de pacientes com hipertrofia miocárdica (Callis et al., 2009; Ferreira et al., 2014).

A produção de miRNAs é um processo complexo e coordenado, que envolve diferentes grupos de enzimas e proteínas nucleares e citoplasmáticas (**Figura 4**).

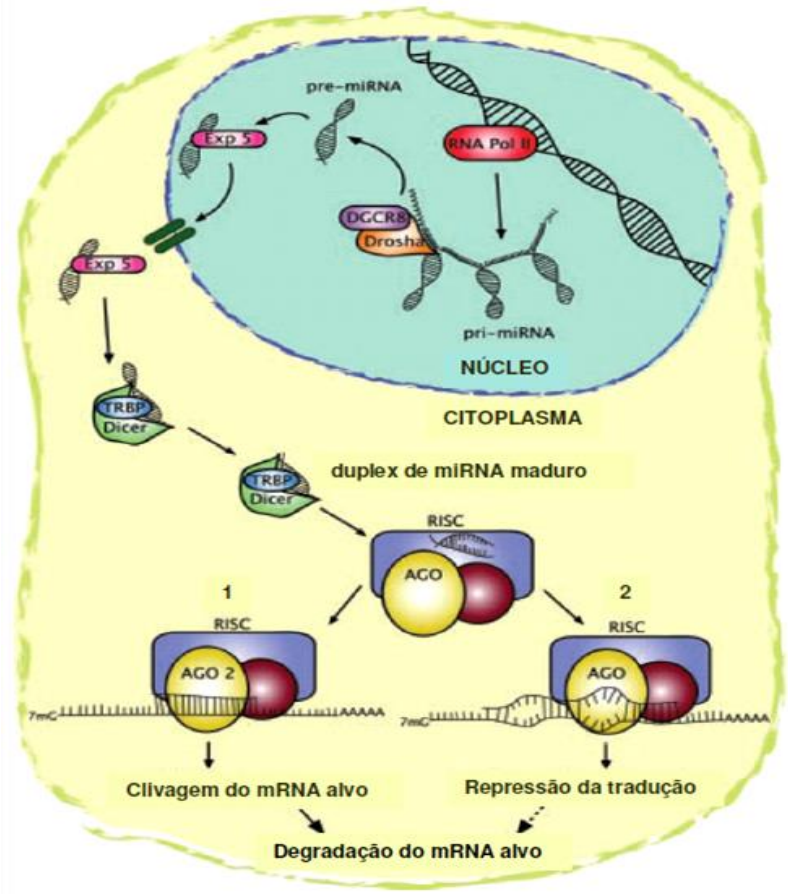


Figura 4. Biogênese de miRNAs e suas vias regulatórias.

Fonte. Modificado de Olena e Paton (2010).

Legenda. pri-miRNA: transcrito primário longo; EXP5: Exportina-5; TRBP: *trans-activation response RNA-binding protein*; Dicer: segunda ribonuclease III; AGO: Argonauta2; RISC: complexo de silenciamento induzido por RNA; 1- Via de degradação do RNAm; 2- Via de repressão da tradução do RNAm alvo. O processo se inicia no núcleo, onde um dado gene que codifica um determinado miRNA é transcrito pela RNA polimerase II, gerando o pri-miRNA. O complexo formado pela enzima RNase III Drosha e seu cofator DGCR8 (complexo Drosha-DGCR8) reconhece e cliva o pri-miRNA originando o pré-miRNA, uma molécula de RNA de 70-100 nt em forma de grampo. Após o processamento nuclear, cada pré-miRNA formado é exportado para o citoplasma pela EXP5, onde é processado pelo duplex TRBP-Dicer, perdendo o *loop*, tornando-se um miRNA duplex. Após a clivagem pela Dicer, a enzima AGO2 é recrutada para formar o RISC, que seleciona uma das fitas do miRNA para permanecer ligada ao complexo (miRNA maduro e funcional com cerca de 22 nt), enquanto

a outra fita é degradada. O RISC encontra o seu RNAm e regula a expressão gênica pelo mecanismo de complementaridade entre as bases do miRNA e RNAm, resultando na repressão da tradução ou degradação do RNAm.

A regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs na região 3' UTR depende essencialmente do grau de complementaridade com o RNAm alvo, o que resulta na inibição traducional ou degradação do RNAm. Nos mamíferos, geralmente ocorre a repressão da tradução, após o pareamento parcial de pelo menos cinco dos oito nucleotídeos da região 5' do miRNA com a extremidade 3' UTR do RNAm alvo (região semente – do inglês '*seed region*'). Uma vez que os miRNAs atuam mesmo sem a necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode ligar-se e regular diferentes RNAm alvos, ou ainda, diferentes miRNAs podem se ligar de forma cooperativa para controlar um único RNAm alvo (Lewis et al., 2003; Doench e Sharp, 2004; Ventura e Jacks, 2009). Assim, miRNAs podem influenciar múltiplas vias de sinalização concomitantemente, demonstrando grande potencial regulatório.

Dada a sua importância em processos biológicos, os miRNAs têm sido objeto de estudo extensivo em pesquisas sobre câncer (Calin e Croce, 2006), em infecções parasitárias (Ferreira et al., 2014) e virais (Houzet e Jeang, 2011), uma vez que interferem diretamente no ciclo replicativo de vários vírus, bem como na progressão de doenças neurológicas e neoplásicas (Tufekci et al., 2010; Eisfeld et al., 2012; Jones et al., 2012; Jr Ode et al., 2012).

Embora alguns vírus expressem seus próprios miRNAs, os que são produzidos pela célula hospedeira também podem atuar mediando a interação

vírus-hospedeiro. Em 2005, pesquisadores descreveram que o hsa-miR-122 facilita a replicação do vírus da hepatite C (HCV), uma vez que, ao ser inibido, promove significativa redução da quantidade de partículas virais produzidas pelos hepatócitos (Jopling et al., 2005). Outro estudo, conduzido em 2007, mostrou indícios de que a expressão aumentada dos hsa-miR-28, -125b, -150, -223 e -382 em células humanas infectadas por HIV-1 pode regular a replicação do vírus, contribuindo para o seu estado de latência (Huang et al., 2007). Recentemente, pesquisadores americanos anunciaram o miR-3151 como novo biomarcador da leucemia mieloide aguda, visto que, quando superexpresso, indica ausência de resposta ao tratamento e sugere prognóstico desfavorável (Eisfeld et al., 2012).

1.4. Infecção por HTLV-1 e miRNAs

Em relação à infecção por HTLV-1, o envolvimento de miRNAs vem sendo pesquisado nos últimos anos, seja em linhagens celulares infectadas, ou em células mononucleares periféricas *ex vivo* de pacientes em diferentes estágios da história natural da infecção (Bouzar e Willems, 2008; Pichler et al., 2008; Aliya et al., 2012; Ruggero et al., 2014; Moles e Nicot, 2015; Shunaeva et al., 2015). Poucos, ao contrário, são os estudos de expressão de miRNAs em células T CD4+ periféricas de indivíduos infectados, precisamente as células-alvo dessa infecção retroviral (Nicolete et al., 2012).

Embora ainda não haja indícios de que o HTLV-1 codifique seus próprios miRNAs, sabe-se que suas proteínas virais podem alterar a

funcionalidade de fatores de transcrição e manipular componentes da maquinaria RNAi na célula hospedeira, o que estabelece uma regulação positiva ou negativa (super- ou sub-expressão) dos miRNAs (Sampey et al., 2012). Como consequência, essa desregulação de miRNAs do hospedeiro afeta as células infectadas por HTLV-1, podendo haver silenciamento de RNAm e/ou o remodelamento da cromatina, mecanismo que regula a transcrição (Aliya et al., 2012). Digno de nota, embora essas alterações induzidas pelos miRNAs possam aumentar a sobrevivência da célula, elevar a capacidade de invasão do vírus e estimular a proliferação e diferenciação celular, podem, ao contrário, induzir o estado de latência viral (Sampey et al., 2012).

Tax, p12, p30 e HBZ são as proteínas do HTLV-1 que estão intimamente relacionadas a mecanismos de regulação de alguns miRNAs. O papel de Tax na superexpressão de hsa-miR-146a e -130b, por meio da via de sinalização do NF-κb, tem sido descrito com frequência (Tomita et al., 2012). No entanto, sabe-se que Tax também pode influenciar outros fatores de transcrição como CREB, AP-1, Myc, p53 e TGF-βeta, ao interromper suas vias de sinalização por mecanismos Tax-dependentes e independentes (Hall e Fujii, 2005; Tabakin-Fix et al., 2006). De forma semelhante, a influência de HBZ para com alguns fatores de transcrição como CREB, AP-1, Myc, STAT5 e p300 também tem sido frequentemente postulada (Nicot et al., 2005; Matsuoka e Green, 2009). Embora Tax e HBZ possam influenciar alguns fatores de transcrição em comum, essa influência apresenta efeitos opostos. Uma vez que a via de CREB pode ser ativada por Tax e reprimida por HBZ,

sugere-se que a expressão de alguns miRNAs dependa, essencialmente, do equilíbrio das atividades protéicas virais na célula. Em estudo com células ATL, pesquisadores franceses mostraram que a sub-expressão do hsa-miR-132, regulado por CREB, pode estar relacionada aos efeitos de HBZ na célula, os quais geralmente se sobrepõem aos de Tax em casos de ATL (Bellon et al., 2009). Diante do exposto e com base em estudos conduzidos nos últimos anos, o **Quadro 1** lista os miRNAs desregulados e RNAm alvos mais frequentemente detectados em linhagens celulares infectadas por HTLV-1 e em amostras de pacientes com HAM/TSP e ATL.

Quadro 1. MicroRNAs desregulados detectados em linhagens celulares infectadas por HTLV-1 e em amostras de pacientes com HAM/TSP e ATL.

Amostra	miRNA hospedeiro	Tipo de regulação	mRNA alvo	Referência	n	Método
Linhagem celular PBMC ATL	**miR-17-3p**	↑	PTEN RB2	Yeung et al., 2008	4	qPCR
Linhagem celular PBMC ATL PBMC HAM/TSP	**miR-21**	↑	PTEN STAT3 AP-1 NF-κb	Pichler et al., 2008 Ghisi et al., 2011 D' Agostino et al., 2012 Sampey et al., 2012	- LCT LCT -	qPCR Microarray - -
Linhagem celular	**miR-24**	↑	Desconhecido	Pichler et al., 2008	LCT	qPCR
PBMC assintomáticos PBMC HAM/TSP	**miR-26a**	↓	Desconhecido	Nicolete et al., 2012	10 13	qPCR
PBMC assintomáticos PBMC HAM/TSP	**miR-29a**	↓	IFN-γ	Nicolete et al., 2012	10 13	qPCR
PBMC ATL	**miR-31**	↓↓ (Profunda repressão)	NF-κb	D' Agostino et al., 2012 Yamagishi et al., 2012	LCT 40	- Microarray
Linhagem celular PBMC ATL	**miR-93**	↑	E2F1 MICB p21 TP53INP1	Yeung et al., 2008 Ghisi et al., 2011 D' Agostino et al., 2012 Sampey et al., 2012 Ruggero et al., 2014	4 LCT LCT - 40	qPCR Microarray - - Microarray
PBMC ATL	**miR-125a**	↓	Desconhecido	Yeung et al., 2008 Bellon et al., 2009 Yamagishi et al., 2012	4 7 40	qPCR Bioarray Microarray
PBMC assintomáticos PBMC HAM/TSP	**miR-125b**	↑	Desconhecido	Nicolete et al., 2012	10 13	qPCR
Linhagem celular PBMC ATL	**miR-130b**	↑	TP53INP1	Yeung et al., 2008	4	qPCR
PBMC HAM/TSP PBMC ATL	**miR-132**	↓	p300 AChe	Bellon et al., 2009 Sampey et al., 2012 Rahman et al., 2012	7 - LCT	Bioarray - qPCR
PBMC ATL	**miR142-5p**	↑	Desconhecido	Bellon et al., 2009	7	Bioarray
PBMC assintomáticos PBMC HAM/TSP		↓		Nicolete et al., 2012	10 13	qPCR
Linhagem celular PBMC ATL	**miR-143-3p**	↑	PKA GRα	Belon et al., 2009 Sampey et al., 2012	7 -	Bioarray -
Linhagem celular PBMC ATL PBMC HAM/TSP	**miR-146a**	↑	TRAF1 IRAK6	Bouzar e Willems, 2008 Pichler et al., 2008 Tomita et al., 2012	- - LCT	qPCR

Quadro 1. Continuação

Amostra	miRNA hospedeiro	Tipo de regulação	mRNA alvo	Referência	n	Método
PBMC ATL	**miR-146b**	↓	Desconhecido	Yamagishi et al., 2012 Pilotti et al., 2013	7 40	Bioarray Microarray
Linhagem celular (ATL)	**miR-149**	↓	P/CAF p300	Nicolete et al., 2012	10 13	qPCR
				Rahman et al., 2012 Sampey et al., 2012	LCT -	qPCR -
PBMC ATL	**miR-150**	↑	STAT1	Yeung et al., 2008 Bellon et al., 2009	4 7	qPCR Bioarray
Linhagem celular (ATL)		↓		Yeung et al., 2008 Ghisi et al., 2011 D' Agostino et al., 2012	LCT	qPCR Bioarray -
Linhagem celular PBMC ATL	**miR-155**	↑	SMAD5	Bouzar e Willems, 2008 Pichler et al., 2008	-	qPCR
PBMC HAM/TSP			TP53INP1	Yeung et al., 2008 Bellon et al., 2009 D' Agostino et al., 2012	4 7 LCT	qPCR Bioarray -
Linhagem celular PBMC ATL	**miR-181a**	↓	Desconhecido	Bellon et al., 2009 Yamagishi et al., 2012	LCT 40	Bioarray Microarray
Linhagem celular PBMC ATL	**miR-181b**	↓	Desconhecido	Ghisi et al., 2011	LCT	Microarray
PBMC assintomáticos PBMC HAM/TSP	**miR-221**	↓	Desconhecido	Ghisi et al., 2011 Nicolete et al., 2012	10 13	qPCR
PBMC HAM/TSP	**miR-222**	↓	Desconhecido	Nicolete et al., 2012	10 13	qPCR
Linhagem celular (ATL) PBMC ATL	**miR-223**	↑	STAT 1	Ghisi et al., 2011	LCT	Bioarray
PBMC ATL	**miR-335**	↓	Desconhecido	Yamagishi et al., 2012	40	Microarray
PBMC assintomáticos PBMC HAM/TSP	**miR-374**	↓	Desconhecido	Nicolete et al., 2012	10 13	qPCR
Linhagem celular (ATL)	**miR-648**	↓	Desconhecido	Nicolete et al., 2012	10 13	qPCR
Linhagem celular (ATL)	**miR-872**	↓	P/CAF p300	Ghisi et al., 2011	LCT	Microarray
Linhagem celular (ATL)	**miR-873**	↓	p300	Sampey et al., 2012	**-**	**-**

↑: Regulação positiva (superexpressão); ↓: Regulação negativa (subexpressão); PBMC: células mononucleares do sangue periférico; LCT: linhagem celular transformada.

Na última década, o padrão de expressão de miRNAs em várias doenças foi pesquisado basicamente por meio de métodos moleculares bem estabelecidos, como o *microarray*, a reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR), e mais raramente, para a descoberta de novos miRNAs, pelo sequenciamento de nova geração (Yu et al., 2006; Sui et al., 2008; Tong et al., 2009; Meng et al., 2012; Durkin et al., 2016). No entanto, como o número total de miRNAs livres é muito menor do que o de RNAm em uma amostra, essa particularidade limita algumas técnicas, uma vez que dificulta consideravelmente a normalização dos resultados obtidos.

Diante disso, grande parte dos estudos que avaliaram o perfil de expressão de miRNAs na infecção por HTLV-1 podem ser considerados limitados (Yeung et al., 2008; Bellon et al., 2009; Rahman et al., 2012; Tomita et al., 2012). O uso frequente de células provenientes de linhagens e o pequeno número de pacientes com HAM/TSP e com ATL avaliados, ainda não permitem realizar uma análise acurada dos dados e definir potenciais biomarcadores de significado diagnóstico ou prognóstico. Adicionalmente, como a qPCR foi o método de escolha na maioria dos estudos, a avaliação do perfil de expressão ficou restrita a pontuais miRNAs.

Com a necessidade de métodos mais sensíveis, específicos e mais abrangentes, no sentido de ampliar o número de miRNAs a serem pesquisados, recentemente a plataforma *TaqMan® Low Density Array (TLDA) MicroRNA* vem emergindo no mercado, permitindo detectar e quantificar a expressão de centenas de miRNAs em uma única amostra. Nessa técnica bastante promissora são utilizados dois painéis compostos por miRNAs

conhecidos, que quando submetidos à qPCR, revelam o perfil global de expressão frente a um total de 754 miRNAs. Alguns estudos têm comparado métodos voltados para detecção de miRNAs, como a *Locked Nucleic Acid* (LNA) *microarray* e *beads array*, e em geral, o TLDA tem apresentado melhor desempenho intra- e interensaios, além de baixos coeficientes de variação (Wang et al., 2011; Smith e Murray, 2012).

Diante do exposto, o presente estudo se propôs avaliar o perfil de expressão de miRNAs em células T CD4+ e CD8+ periféricas de indivíduos assintomáticos infectados por HTLV-1 e de pacientes com HAM/TSP, utilizando a plataforma TLDA.

2. OBJETIVOS

- Quantificar a expressão de miRNAs humanos conhecidos em células T CD4+ e T CD8+ de indivíduos infectados por HTLV-1 assintomáticos e de pacientes com HAM/TSP;
- Identificar padrões de expressão de miRNAs desregulados que possam caracterizar os grupos de pacientes estudados, de acordo com suas condições clínicas;
- Investigar associações entre os padrões de expressão desregulada de miRNAs identificados com a expressão de genes virais (*tax* e *HBZ*) e com a carga proviral de HTLV-1 em sangue periférico.

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento da pesquisa

O trabalho foi realizado com delineamento de um estudo transversal com componente descritivo e analítico, precedido de otimização de técnicas moleculares.

3.2. Locais e período de realização do estudo

O estudo foi realizado nos Laboratórios de Investigação Médica em Virologia (LIM-52), em Imunologia Clínica e Alergia (LIM-60) e em Histocompatibilidade e Imunidade Celular (LIM-19) do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), e em parceria com o Ambulatório de assistência a pessoas infectadas pelos vírus HTLV-1/2 da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP e com a *George Washington University,* Washington D.C., Estados Unidos da América.

O processamento das amostras e as determinações quantitativas de linfócitos T CD4+ e T CD8+, foram realizadas no LIM-60; a quantificação da CPV de HTLV-1 e a determinação da expressão de genes virais foram executadas na *George Washington University,* Washington D.C; e por fim, a análise da expressão de miRNAs foi realizada no LIM-19, que dispõe do equipamento *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR Systems* (*Applied*

Biosystems) e dos programas de bioinformática apropriados para a análise dos dados.

3.3. Seleção dos participantes do estudo

A população de estudo foi selecionada mediante amostragem de conveniência entre pacientes infectados por HTLV-1 em acompanhamento clínico no ambulatório HTLV do HC-FMUSP, após apresentação do protocolo de pesquisa e obtenção de anuência voluntária, totalizando 41 indivíduos recrutados.

O diagnóstico de infecção por HTLV-1 baseou-se na identificação de resultados positivos em pelo menos um dos testes confirmatórios, sorológico (*Western blot* - WB) e/ou molecular (reação em cadeia da polimerase - PCR), de acordo com o preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil (Brasil, 2003). Adicionalmente foram selecionados por conveniência 14 funcionários da mesma Instituição, não infectados por HTLV-1, que compuseram o grupo controle. Para a inclusão no estudo exigiu-se que os pacientes infectados por HTLV-1, bem como os controles, apresentassem resultado negativo para a infecção por HTLV-2 (WB e/ou PCR), por HIV (anti-HIV 1/2), Hepatites B (anti-HBc e HBsAg) e C (anti-HCV e NAT HCV), Sífilis (ELISA) e doença de Chagas (ELISA) e avaliação clínica para tuberculose ativa.

No presente estudo, os 41 infectados por HTLV-1 foram classificados como portadores assintomáticos de HTLV-1 (ASS, n= 23) ou pacientes com HAM/TSP (HAM, n=18). Para tal classificação, cada paciente foi avaliado e teve seu *status* clínico definido com base nos critérios diagnósticos propostos

pela OMS (Osame et al., 1990) (**Quadro 2**) e de acordo com os níveis de verificação para critérios diagnósticos da HAM/TSP adotados por clínicos brasileiros (Castro-Costa et al., 2006) (**Quadro 3**). Dos 18 pacientes incluídos no grupo HAM, 16 preenchiam os critérios brasileiros para diagnóstico definitivo de HAM e dois para diagnóstico provável dessa afecção.

Quadro 2. Critérios diagnósticos da OMS para definir HAM/TSP.

I. Critérios clínicos
Um único sintoma ou um sinal físico podem ser evidências de HAM/TSP adiantado.
A. Incidência da idade e do sexo
Na maior parte, esporádico e adulto, mas às vezes familia; visto ocasionalmente na infância; sexo feminino predominante.
B. Início
É geralmente insidioso, mas pode ser repentino.
C. Manifestações neurológicas principais
1. A PET crônica, que progride geralmente lentamente, permanece, às vezes, estática após a progressão inicial.
2. Fraqueza dos membros inferiores.
3. Distúrbio da bexiga geralmente é uma característica avançada. A constipação ocorre geralmente mais tarde; impotência ou libido diminuídas são comuns.
4. Os sintomas sensoriais, tais como formigamento, queimores, etc., são mais proeminentes do que sinais físicos objetivos.
5. A baixa dor lombar com irradiação para os pés é comum.
6. O sentido da vibração é danificado freqüentemente.
7. Hiperreflexia dos membros inferiores, freqüentemente com clônus e sinal de Babinski.
8. Hiperreflexia dos membros superiores; sinais positivos de Hoffmann e de Tromner freqüentes; a fraqueza pode ser ausente.
D. Resultados neurológicos menos freqüentes. Sinais cerebelares, atrofia ótica, surdez, nistagmo, tremor da mão. Convulsões, demência ou consciência danificada é raro.
E. Outras manifestações neurológicas que podem ser associadas com a HAM/TSP: atrofia muscular, polimiosite, neuropatia periférica, meningite, encefalopatia.
F. Manifestações não neurológicas sistemáticas que podem ser associadas com a HAM/TSP: alveolite pulmonar, uveíte, síndrome de Sjögren, artropatia, vasculite, ictiose, crioglobulinemia, LLTA.
II. Diagnóstico laboratorial
A. Presença dos anticorpos HTLV-1 ou dos antígenos no sangue e no líquido cerebrospinal (LCR).
B. LCR pode mostrar a pleocitose suave do linfócito.
C. Os linfócitos lobulados podem estar no sangue e/ou no LCR.
D. Aumento moderado das proteínas no LCR.
E. Isolamento viral, quando possível, do sangue e/ou do LCR.

Fonte. Osame et al. (1990).

Quadro 3. Níveis de verificação para critérios diagnósticos da HAM/TSP.

Definitivo
1. Uma paraparesia espástica progressiva percebida pelo paciente. Os sintomas sensoriais ou os sinais podem ou não estar presentes. Os sinais ou os sintomas do esfíncter urinário e anal podem ou não estar presentes.
2. Presença de anticorpos de HTLV-1 no soro e no LCR confirmados pelo WB e/ou por uma PCR positiva para HTLV-1 no sangue e/ou no LCR.
3. Exclusão de outras desordens que podem se assemelhar a HAM/TSP.
Provável
1. Apresentação monossintomática: espasticidade ou hiperreflexia nos membros inferiores ou sinal isolado de Babinski, com ou sem sinais sensoriais ou bexiga neurogênica confirmada somente por testes urodinâmicos.
2. Presença de anticorpos de HTLV-1 no soro e/ou LCR confirmados pelo WB e/ou por uma PCR positiva para HTLV-1 no sangue e/ou no LCR.
3. Exclusão de outras desordens que podem se assemelhar a HAM/TSP.
Possível
1. Apresentação clínica completa ou incompleta.
2. Presença de anticorpos de HTLV-1 no soro e/ou no LCR confirmados pelo WB e/ou por uma PCR positiva para HTLV-1 no sangue e/ou no LCR.
3. As desordens que podem se assemelhar a HAM/TSP não foram excluídas

Fonte. Castro-Costa et al. (2006).

3.4. Procedimentos do estudo

3.4.1. Coleta de dados dos participantes

Em entrevistas individuais com os participantes do estudo (ASS, HAM e CN), ou ainda por meio de revisão dos seus respectivos prontuários foram coletados dados sócio-demográficos e clínicos de interesse (**Anexo 1**). Deu-se especial atenção a dados obtidos na anamnese e exame físico que correspondiam à condição clínica do indivíduo no momento da coleta de amostras de sangue para avaliação laboratorial prevista no protocolo.

3.4.2. Coleta de amostras de sangue

Nos funcionários do HC-FMUSP, nos portadores assintomáticos e nos pacientes com HAM/TSP foi feita uma punção venosa periférica em antebraço com coleta de 60 a 80 mL de sangue em tubos a vácuo com EDTA para obtenção de sangue total, plasma e PBMCs.

De acordo com o agendamento das consultas, à medida que as amostras de sangue foram colhidas, foram encaminhadas a temperatura ambiente ao LIM-60 para processamento pré-analítico em até 24h e acondicionamento adequado até a realização dos testes.

3.4.3. Processamento das amostras

A **Figura** 5 apresenta de forma gráfica a sequência de procedimentos do protocolo de investigação laboratorial a qual os participantes do estudo foram submetidos.

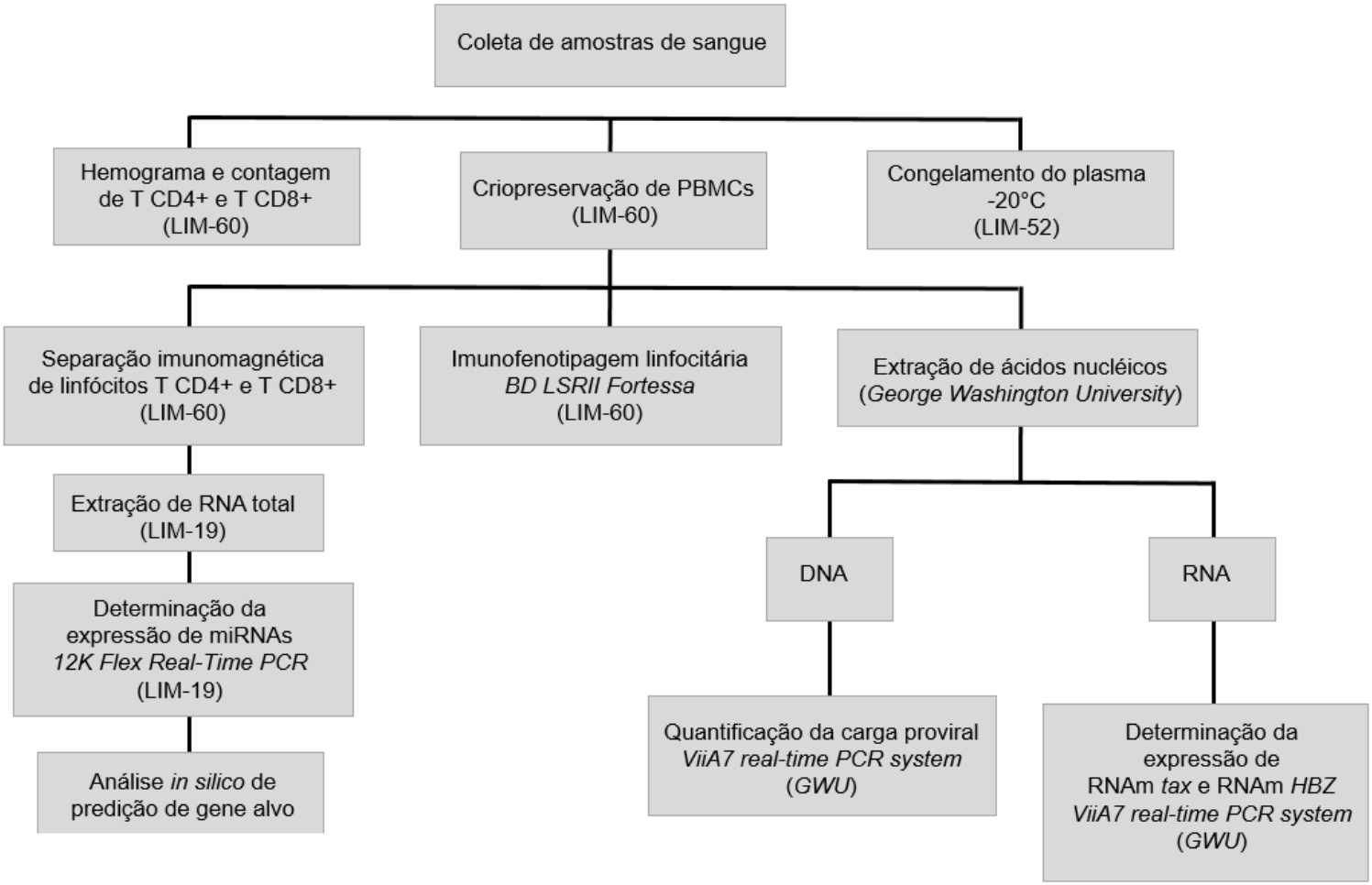


Figura 5. Fluxograma da estratégia experimental adotada no presente estudo.

3.4.3.1. Obtenção de plasma. Os tubos de sangue contendo EDTA foram centrifugados a 3000 rpm por 7 minutos e o plasma foi separado e armazenado a -20°C.

3.4.3.2. Obtenção de PBMCs. O sangue colhido em EDTA foi processado por centrifugação de gradiente com *Ficoll-Paque PLUS* (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) para separação de PBMCs. As células isoladas foram avaliadas quanto à viabilidade pela coloração por azul de tripan 1% (Sigma) e criopreservadas em DMSO 10% no soro fetal bovino (FBS) na concentração celular estabelecida de 1 x 10^7 células/mL (Leal, 2012).

3.4.3.3. Descongelamento de PBMCs. As células criopreservadas foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37°C. Em seguida, 1 mL de RPMI 1640 com 10% de FBS (meio de cultura - R10) a 37°C foi adicionado ao tubo. O volume total foi transferido para um tubo Falcon contendo 10 mL de R10 a 37°C e as amostras centrifugadas por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e as células diluídas em 5 mL de R10 para realização da contagem celular em lâminas do equipamento *Countess II FL Automated Cell Counter* (Thermo Fisher Scientific). Após a contagem, as amostras foram novamente centrifugadas para o ajuste de concentração a 5 x 10^6 células/mL para determinação da carga proviral de HTLV-1 e 1 x 10^6 células/mL experimentos de citometria de fluxo (Leal, 2012).

3.4.3.4. Obtenção de linfócitos T CD4+ e T CD8+. Os linfócitos T CD4+ e CD8+ foram isolados e selecionados positivamente em coluna imunomagnética LS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha) a partir das PBMCs descongeladas. Para tal seleção foram utilizados, separadamente, anticorpos monoclonais anti-CD4+ (Miltenyl Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha) e anti-CD8+ acoplados a microesferas magnéticas, de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as PBMCs foram centrifugadas a 1700 rpm durante 10 minutos e ressuspendidas em 10 mL de MACS *Buffer* gelado para coluna, contendo PBS (1X) pH 7,2, 0,5% soro albumina bovina (BSA) e 2 mM de ácido citrato dextrose (EDTA). Primeiramente, foi feita a marcação com 30 µL de anti-CD8-PE. Para cada 1 x 10^7 células foram utilizados 40 µL de tampão gelado de coluna e 20 µL de anti-CD4 e anti-PE marcados com microesferas magnéticas. Após essa marcação, as células foram homogeneizadas, incubadas por 15 minutos a 4°C e em seguida, lavadas com 2 mL de tampão de coluna e ressuspendidas em um volume final de 500 µL. Após a ativação da coluna imunomagnética com 3 mL de tampão de coluna, a suspensão de células foi eluída, ficando as células marcadas com anti-CD4 e anti CD8+ retidas. Para remover as células não ligadas, a coluna foi lavada 3 vezes com 3 mL de tampão de coluna e após o eluído ter sido totalmente desprezado, a coluna foi retirada do campo magnético. Acrescentaram-se 5 mL de tampão de coluna para a obtenção das células marcadas com as microesferas magnéticas. Essas células foram centrifugadas a 1700 rpm durante 10 minutos e ressuspendidas em 1 mL de PBS (1X). O rendimento da separação imunomagnética dos linfócitos T CD4+

e T CD8+ foi avaliado por contagem de células em lâminas do equipamento *Countess II FL Automated Cell Counter* (Thermo Fisher Scientific). Para avaliação da pureza das células obtidas, 0,5 a 1 x 10^6 células foram separadas para citometria de fluxo e o restante preservado em *RNAlater*® (Thermo Fisher Scientific) na proporção 1:4 (v/v) (250 µL de PBS contendo as células + 750 µL de *RNAlater*®), para posterior extração de RNA.

3.4.3.5. Avaliação da pureza das células isoladas. A pureza das células isoladas na coluna imunomagnética foi avaliada por citometria de fluxo (*BD LSRII Fortessa*, Becton Dickinson Immunodiagnostic Systems, San Jose, CA, EUA). Para tanto, foram utilizados quatro tubos contendo as seguintes marcações: CD4-FITC e CD3-PE (marcadores de linfócitos T CD4+), CD8-FICT e CD3-PE (marcadores de linfócitos T CD8+), CD19-PE (marcador de linfócitos B) e CD14-PE (marcador de monócitos) e um tubo controle (BD Bioscience). Em cada tubo, foram adicionadas 1 x 10^5 células e 3 µL de cada anticorpo. Após incubação por 15 minutos no escuro e a temperatura ambiente, foram adicionados 2 mL de PBS (1X) para lavagem dos anticorpos não ligados. Foi realizada centrifugação a 1700 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspendidas em 200 µL de PBS (1X) para a análise no citômetro de fluxo. Os dados dos experimentos foram analisados, adquirindo-se 10.000 eventos. Os resultados foram plotados em função dos parâmetros de *forward scatter* (FSC), que equivale ao tamanho, e de *side scatter* (SSC), que corresponde à granularidade das células. Dessa forma, as populações de linfócitos foram selecionadas e as células de

interesse marcadas com os anticorpos foram lidas, gerando um gráfico de pontos (*dot plot*). No presente estudo, foram consideradas aceitáveis apenas as amostras que apresentaram pureza acima de 85% (Pinto, 2011).

3.5. Extração de ácidos nucleicos a partir de PBMCs

3.5.1. Extração de DNA para detecção da carga proviral. O DNA proviral de HTLV-1 foi extraído de PBMCs, utilizando um *kit* comercial *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini* Handbook, Quiagen®, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi armazenado a -20°C até o momento das qPCRs para detecção da CPV.

3.5.2. Extração de RNA para detecção da expressão de genes virais. O RNA total foi extraído de PBMCs, usando o *RNeasy Mini Kit* com digestão de DNAse em coluna de sílica (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha). O cDNA foi sintetizado, partindo de 1µg de RNA total, usando o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* que contém *random primers* (Applied Biosystems, Foster City, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi armazenado a -80°C até o momento das qPCRs para detecção da expressão gênica.

3.5.3. Extração de RNA total para detecção da expressão de microRNAs. Às células T CD4+ e T CD8+ dos indivíduos avaliados foi adicionado Tampão de Lise (*mirVana™ microRNA Isolation Kit*, Ambion,

Austin, TX, EUA). Tendo em vista que os controles endógenos presentes nas placas *TLDA* são RNAs nucleolares (RNU-44 e RNU-48), maiores que microRNAs, foi feita a extração de RNA total das células, uma vez que, utilizando-se o protocolo para obtenção da fração enriquecida para microRNAs, RNAs endógenos poderiam ser eliminados. Para a extração de RNA total foi utilizado o kit *mirVana™ microRNA Isolation Kit* (*Ambion*, Austin, TX, EUA), que tem como base a extração orgânica com solução de fenol-clorofórmio. A fase aquosa de cada alíquota foi recuperada, misturada a etanol 100% e o RNA total foi imobilizado em coluna de fibra de vidro. Após três lavagens com tampões específicos fornecidos com o kit, o RNA foi eluído em 30 µL de água livre de nucleases a 95ºC (*Nucleasefree Water*, *Ambion*, Austin, TX, EUA). O cDNA das células foi retrotranscrito, usando o *miRNA reverse transcription kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, United States) em combinação com o *stem-loop Megaplex primer pool* (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. O cDNA foi armazenado a -80°C até o momento das qPCRs para detecção da expressão de miRNAs.

3.5.4. Avaliação da pureza do RNA total isolado. A quantificação de RNA total foi feita em espectrofotômetro (*Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer; NanoDrop Technologies*, Delaware, EUA), com base na relação da absorbância A_{260nm}/A_{280nm} e da leitura a A_{230nm}. O grau de pureza que se refere à presença de contaminantes proteicos na amostra de RNA foi obtido pela razão A_{260nm}/A_{280nm}, enquanto a razão 260/230 indica a presença

de outros contaminantes, como fenol, carboidratos e EDTA. Ambos as razões com valores próximos a 2,0 são indicadores de qualidade.

3.6. Protocolo de investigação laboratorial

Conforme ilustrado na **Figura 5**, o protocolo de investigação laboratorial do estudo compreendeu as etapas relacionadas a seguir:

1. Leucograma e caracterização imunofenotípica de subpopulações de linfócitos T;
2. Determinação da CPV absoluta de HTLV-1 em PBMCs, classificando a população estudada em duas categorias: CPV baixa (≤ 50 cópias/1000 PBMCs) e CPV alta (> 51 cópias/1000 PBMCs);
3. Determinação da expressão relativa de *tax* e *HBZ* de HTLV-1;
4. Detecção relativa da expressão global de miRNAs conhecidos.

Passa-se a seguir a descrição detalhada das referidas etapas.

3.6.1. Leucograma e contagem de células T CD4+ e T CD8+

A contagem global do número de leucócitos no sangue periférico foi obtida pelo hemograma completo, realizado no equipamento *COULTER® AC·T diff* (Beckman Coulter Inc, Fullerton, Califórnia, EUA).

A contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+ foi realizada por citometria de fluxo, utilizando-se o citômetro *BD LSRII Fortessa* (Becton Dickinson

Immunodiagnostic Systems, San Jose, CA, EUA) e o reagente *MultiTest* CD3/FITC, CD8/PE, CD45/PerCP e CD4/APC (BD Biosciences©), conforme descrito na **Quadro 4**.

Quadro 4. Definição dos títulos dos anticorpos utilizados na contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+.

Anticorpos	Fluorocromo	Clone
CD3	FITC	SK7
CD4	APC	2D1
CD8	PE	SK1
CD45	PerCP	SK3
Viabilidade celular	Am Cyan	

Para a marcação das células, a 1 x 10^6 células de cada paciente foram adicionados 20 µL do mix de anticorpos monoclonais que compõe o *MultiTest* e do marcador de viabilidade. Após incubação por 15 minutos a temperatura ambiente e mantidas ao abrigo da luz, as células foram lisadas, usando *BD FACS Lysing* (BD Biosciences©). Em seguida, foram lavadas em solução tampão *MACS Buffer* para remoção de anticorpos não incorporados e marcação inespecífica, fixadas com Paraformaldeído (PFA) 1% (SIGMA®) e transferidas para tubos de citometria para aquisição no citômetro *BD LSRII Fortessa* (Becton Dickinson Immunodiagnostic Systems, San Jose, CA, EUA). Foram adquiridos 10.000 eventos e estabeleceu-se uma região correspondente à população linfocitária, em função da baixa granularidade

celular (*side scatter* - SSC) e da marcação positiva para CD3. Das células selecionadas nessa região foram quantificadas as células T CD4+ e T CD8+, gerando uma contagem absoluta das subpopulações.

Os dados gerados da aquisição no citômetro de fluxo foram analisados no programa *Flowjo* (TreeStar, San Carlos, Califórnia, USA) e a definição dos *gates* foi baseada na qualidade da aquisição (*Time* e *singlets*), seguida da identificação de linfócitos T CD4+ e T CD8+. Os resultados obtidos da citometria foram analisados em planilha de dados do Programa Excel do Pacote Office (Microsoft Corporation, Seathe, WA, EUA) e programa estatístico *Graphpad Prism*, versão 7.0.

A **Figura 6** apresenta a estratégia utilizada para a avaliação imunofenotípica dos linfócitos.

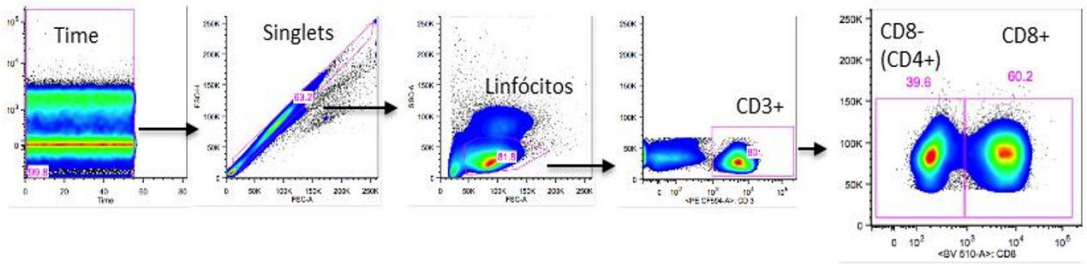


Figura 6. Estratégia de análise utilizada no painel de citometria de fluxo de linfócitos T em amostra de PBMC de indivíduos sadios, portadores assintomáticos de HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP. A análise foi feita com base na qualidade da aquisição (*Time* e *singlets*), seguida da identificação de linfócitos T CD4+ e CD8+.

A razão das células T CD4+ e T CD8+ foi calculada, cujos resultados acima de 1,2 evidenciam qualidade da imunidade adaptativa do indivíduo.

3.6.2. Detecção de carga proviral de HTLV-1 por qPCR

O DNA proviral de HTLV-1 foi extraído de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), utilizando um *kit* comercial *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini* Handbook, Quiagen®, de acordo com as instruções do fabricante. Além da linhagem MT-2 utilizada como controle positivo para HTLV-1, segmento de DNA de albumina humana foi pesquisado como controle endógeno. Em cada reação, também foram incluídas amostras que não continham DNA de HTLV-1 como controle negativo.

Para a quantificação da carga proviral de HTLV-1 foi realizada a pesquisa de segmento do genoma proviral do vírus pela PCR, segundo o protocolo adotado por Saito et al. (2009). Com a finalidade de otimizar o ensaio foi utilizada alíquota do duplo plasmídeo HTLV-Albumina construído por clonagem em um vetor pcDNA 3.1 (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) para construção de curva padrão e consequente definição do número de cópias de HTLV-1 por célula. Esse plasmídeo contém uma porção do íntron 12 do gene da albumina humana (posição 15758-16940, n° acesso GenBank M12523) e segmento do genoma de HTLV-1 (posição 4708-4953, n° acesso GenBank J02029) (Seiki et al, 1983) obtido da linhagem celular MT2, linhagem celular linfoblastóide humana infectada por HTLV-1 (ECACC 93121518, Miyoshi et al, 1981), que possui 2,1 cópias de HTLV-1 por célula. Dessa forma, após a extração e quantificação do DNA do plasmídeo foram realizadas diluições em escala logarítmica log10 (10^6, 10^5 ,10^4, 10^3 e 10^2 cópias de gene/mL).

Foram utilizados 200 ng de DNA genômico de cada amostra para a quantificação. Todas as diluições da curva padrão e as amostras dos pacientes foram testadas em duplicata. O ensaio de PCR em tempo real pesquisou duas sequências-alvo: o gene da albumina humana como controle endógeno e o gene *pol* de HTLV-1. O protocolo e condições da reação são apresentados nos **Quadros 5** e **6.**

Quadro 5. *Primers* e sonda utilizados nas reações de PCR em tempo real (albumina humana e *pol*) para a detecção de DNA endógeno e proviral de HTLV-1, respectivamente.

Genes e sondas	*Primers*	Sequência 5' – 3' e n° de nucleotídeos ( )
Albumina humana[a]	Alb S Alb AS	5' GCT GTC ATC TCT TGT GGG CTG T 3' (22pb) 5' AAA CTC ATG GGA GCT GCT GGT T 3' (22pb)
Sonda *Taqman*[b]	Alb	5'-FAM CCT GTC ATG CCC ACA CAA ATC TCT CC-TAMRA-3' (29pb)
pol[c]	SK 110 SK 111	5' CCC TAC AAT CCA ACC AGC TCA G 3' (22pb) 5' GTG GTG AAG CTG CCA TCG GGT TTT 3' (24pb)
Sonda *Taqman*[d]	*pol*	5'-FAM CTT TAC TGA CAA ACC CGA CCT ACC CAT GGA TAMRA-3' (30pb)

pb: pares de bases nitrogenadas.

[a] Nucleotídeos de HTLV-1: número de acesso em GenBank J02029

[b] Nucleotídeos de HTLV-1: sonda carreando um 5' *fluorescent reporter dye FAM* (6-carboxy fluorescein) e um 3' *quencher dye TAMRA* (6-carboxy tetramethyl rhodamine)

[c] Nucleotídeos de HTLV-1: posições 4758-4779 e 4943-4920 e número de acesso em GenBank J02029

[d] Nucleotídeos de HTLV-1: posição 4829-4858, carreando um 5' *fluorescent reporter dye FAM* (6-carboxy fluorescein) e um 3' *quencher dye TAMRA* (6-carboxy tetramethyl rhodamine)

Quadro 6. Protocolo adotado nas reações de PCR em tempo real (*tax* e albumina) para a identificação dos respectivos segmentos genômicos, humano e do HTLV-1.

Condições de reação	PCR em tempo real *tax* / albumina	Termociclagem
Tampão Tris 10X	2,5 μL	50°C - 2' 95°C - 10'
$MgCl_2$ 50 mM	1 μL	95°C - 15" 65°C - 1' (45 ciclos)
Solução de dNTPs (10 mM - cada)	0,5 μL	
Primer sense (10 pmol/μL)	0,5 μL	
Primer anti-sense (10 pmol/μL)	0,5 μL	4°C - ∞
Sonda HTLV-1 ou Albumina (10 nM)	0,5 μL	
H_2O q.s.p. 25 μL	11,8 μL	
Gold *Taq* polymerase	0,2 μL	
Amostra de DNA	5 μL	
Volume final	**25 μL**	

A amplificação foi realizada no sistema *ViiA7 real-time PCR system* (Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA, USA). O ciclo limite para cada amostra foi calculado pela definição do ponto em que a fluorescência ultrapassava um determinado limite. Cada amostra foi analisada em duplicata e a média dos dois valores foi considerada como o valor de Δ*Ct*.

A quantidade de provírus de HTLV-1 foi calculada, utilizando a seguinte equação:

$$\text{Carga proviral} = \frac{\text{Média do número de cópias de HTLV-1 (tax)}}{\text{Média do número de cópias de albumina / 2}} \times 1000 / \text{PBMC}$$

O método permite detectar uma cópia de HTLV-1 por 10^3 PBMC.

Para construção da curva padrão foram utilizadas como controle positivo, células da linhagem MT-2, que possui o genoma proviral completo de HTLV-1 inserido em seu material genético. Além da linhagem, amostras de PBMCs de pacientes HTLV-1 negativos foram utilizadas para a pesquisa de *β-globina* endógena e como controle negativo de reação. Foram realizadas diluições seriadas das amostras de DNA extraídas da linhagem, partindo de uma concentração inicial de 10^5 células até a concentração final de 10^0 células. A construção das curvas padrão para HTLV-1 e betaglobina foi realizada com determinações em duplicata e aceitas quando apresentaram *slopes* de -3,74 a -3,32 (que demonstra eficiência de amplificação de 85 a 100%) e coeficiente de correlação linear (R^2) > 0,99 (que indica quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de *Ct* das amostras padrão). Feita a determinação da carga proviral, as amostras dos indivíduos infectados (ASS e HAM) foram classificadas em duas categorias: CPV baixa (≤ 50 cópias/1000 PBMCs) e CPV alta (>50 cópias/1000 PBMCs).

3.6.3. Detecção da expressão de *tax* e *HBZ* de HTLV-1

O RNA total foi extraído de PBMC, usando o *RNeasy Mini Kit* com digestão de DNAse em coluna de sílica (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha). O cDNA foi sintetizado partindo de 1µg de RNA total, usando o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* que contém *random primers* (Applied Biosystems, Foster City, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

O protocolo otimizado tomou como base as publicações de Saito et al. (2009). A determinação da expressão de *tax* e *HBZ* foi realizada por PCR em tempo real. Com a finalidade de otimizar e avaliar a sensibilidade do ensaio molecular, foi utilizado material genético extraído da linhagem celular MT-2. Como controle endógeno de reação foi pesquisado segmento de RNAm do gene humano HPRT (hipoxantina-ribosil-transferase). Em cada reação foi incluída uma amostra negativa para a infecção por HTLV-1 como controle negativo. O protocolo e condições da reação são apresentados nos **Quadros 7** e **8.**

Quadro 7. *Primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real (*tax*, *HBZ* e *HPRT*) para a determinação de seus respectivos RNAm.

Genes e sondas	*Primers*	Sequência 5' – 3' e n° de nucleotídeos ( )
tax	*Tax*-F	5' ATC CCG TGG AGA CTC CTC AA 3' (20pb)
	Tax-R	5' ATC CCG TGG AGA CTC CTC AA 3' (20pb)
Sonda *Taqman*[a]	5' TCC AAC ACC ATG GCC CAC TTC CC 3' (23pb)	
HBZ	*Tax*-F	5' AGA ACG CGA CTC AAC CGG 3' (18pb)
	Tax-R	5' TCC AAC ACC ATG GCC CAC TTC CC 3' (23pb)
Sonda *Taqman*[a]	5' TGG ATG GCG GCC TCA GGG CT 3' (21pb)	
HPRT[b]	HPRT -F	5'GCT ATA AAT TCT TTG CTG ACC TGC TG 3' (26pb)
	HPRT -R	5'AAT TAC TTT TAT GTC CCC TGT TGA CTG G 3' (27pb)

pb: pares de bases nitrogenadas.

[a] Sonda carreando um 5' *fluorescent reporter dye FAM* (6-carboxy fluorescein) e um 3' *quencher dye TAMRA* (6-carboxy tetramethyl rhodamine)

[b] *HPRT primers and probe set* (Applied Biosystems)

Quadro 8. Protocolo adotado nas reações de PCR em tempo real (*tax*, *HBZ* e *HPRT*) para a identificação dos respectivos segmentos genômicos do HTLV-1 e humano.

Condições de reação	PCR em tempo real *tax* / *HBZ* / *HPRT*	Termociclagem
1X Taq Man Universal Master Mix II PCR	12,5 μL	50°C - 2' 95°C - 10'
Primer sense (10 nM)	0,5 μL	95°C - 15" (45 ciclos)
Primer anti-sense (10 nM)	0,5 μL	65°C - 1' (45 ciclos)
Sonda (10 nM)	0,25 μL	4°C - ∞
H_2O q.s.p. 25 μL	1,25μL	
Amostra de cDNA	10 μL	
Volume final	**25 μL**	

As reações de amplificação para cada gene foram feitas separadamente, usando o sistema *ViiA7 real-time PCR system* (Applied Biosystems, Inc. Foster City, CA, USA). O ciclo limite para cada amostra foi calculado pela definição do ponto em que a fluorescência ultrapassava um determinado limite. Cada amostra foi analisada em duplicata e a média dos dois valores foi considerada como o valor de Δ*Ct*.

As expressões dos RNAm Tax e RNAm HBZ foram calculadas, utilizando as seguintes equações:

$$\textit{Expressão de RNAm tax} = \frac{\textit{Intensidade de sinal detectado de tax}}{\textit{Intensidade de sinal detectado de HPRT}}$$

$$\textit{Expressão de RNAm HBZ} = \frac{\textit{Intensidade de sinal detectado de HBZ}}{\textit{Intensidade de sinal detectado de HPRT}}$$

A expressão dos genes virais foi normalizada pela carga proviral, ajustando-a com base no número de células infectadas (razão RNAm/DNA proviral).

3.6.4. Quantificação da expressão de miRNAs conhecidos

3.6.4.1. Seleção das amostras e extração de RNA total

Para o ensaio de qPCR para determinação do perfil de expressão de miRNAs foram selecionadas células T CD4+ e T CD8+ de 36 indivíduos infectados por HTLV-1 (ASS=19 e HAM=17) e de 14 indivíduos sadios não infectados por esse retrovírus, como controles. A seleção foi feita com base em critérios de homogeneidade e representatividade, considerando a faixa etária, sexo, o grupo clínico ao qual pertenciam (CN, ASS ou HAM), a pureza

(>85%) das células obtidas após separação por *microbeads* e a concentração do RNA total obtido (>10 ng). A idade e sexo dos controles foram pareados com as características demográficas dos portadores assintomáticos e pacientes com HAM/TSP, garantindo assim, homogeneidade na composição da população de estudo.

A **Figura 7** apresenta a estratégia adotada para a seleção de amostras para a determinação da expressão de miRNAs.

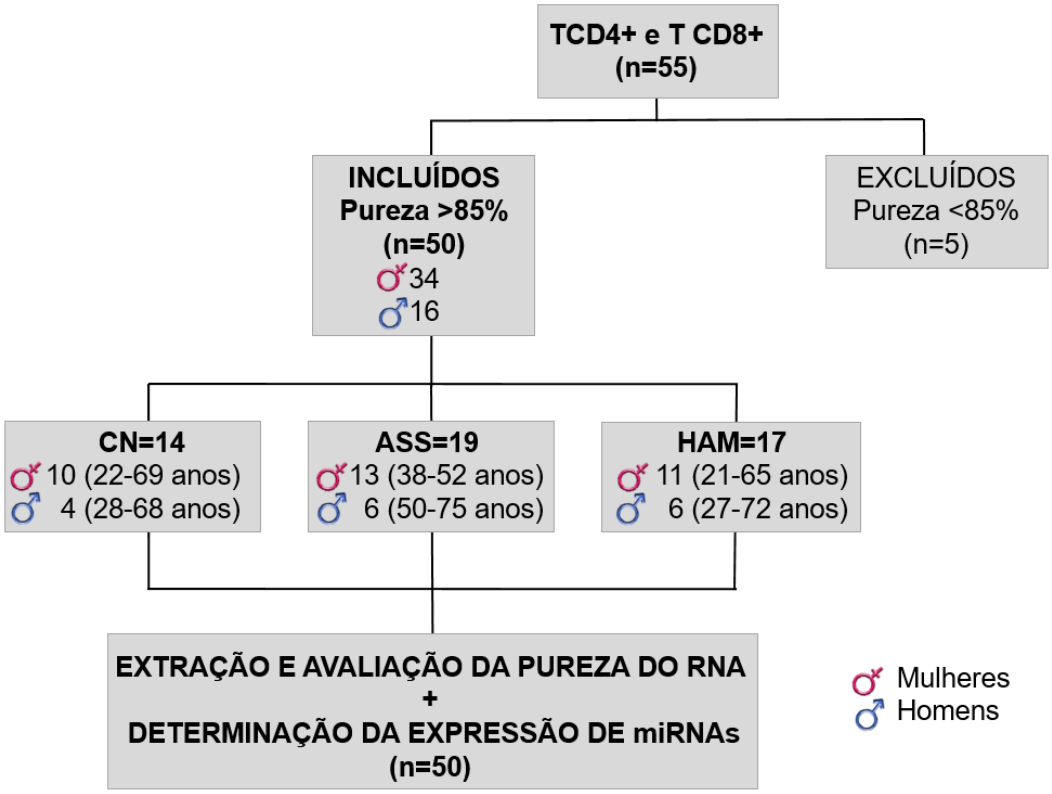


Figura 7. Estratégia adotada para a seleção de amostras submetidas à qPCR para detecção da expressão de miRNAs.

3.6.4.2. Transcrição reversa (RT)

Para a reação de transcrição reversa foi utilizado o kit *TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit* e *Megaplex™ RT Primers, Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA, constituído de dois *pools* de *primers* (A e B) com sequências de bases nitrogenadas complementares às dos microRNAs a serem pesquisados. Considerando um volume final de 15 µL, a reação foi feita com 10 ng de RNA total, *Megaplex™ RT Primers*, dNTPs, a enzima transcriptase reversa *MultiScribe™*, tampão do kit, $MgCl_2$, inibidor de RNAses e água livre de nucleases. O tubo contendo a reação foi incubado no gelo por 5 minutos e, em seguida, submetido a termociclagem no equipamento *Veriti® 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), sob as seguintes condições de ciclagem:

- 40 ciclos: 16°C por 2 minutos, 42°C por 1 minuto e 50°C por 1 minuto
- 85°C por 5 minutos
- 4°C ∞

As amostras foram armazenadas a -20ºC até a realização dos ensaios de PCR.

3.6.4.3. Detecção da expressão de microRNAs por *TLDA*

Para detecção e quantificação relativa de miRNAs de linfócitos T CD4+ e CD8+ foram utilizadas duas placas (*TLDA Panel A* **- Figura 8** e *TLDA Panel B* - **Figura 9**) de 384 poços com canais microfluídicos para ensaios de baixa densidade (*TaqMan® Low Density Array 384-well microfluidic cards; Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) para cada amostra de cDNA testada. Nos painéis uma sonda individual foi previamente imobilizada pelo fabricante em cada poço, permitindo a avaliação da expressão global de um total de 754 miRNAs de humanos (*TaqMan® Array Human MicroRNA A+B Cards Set v3.0, Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) (TLDA). Cada painel inclui controles endógenos (RNU-44 e RNU-48), o controle positivo U6, relacionado a mamíferos (MammU6) e o ath-miR159a, não relacionado a mamíferos, referenciado como controle negativo de reação. Todos esses estão dispostos em quadruplicata em cada painel. Os resultados de expressão do grupo CN foram utilizados como calibrador da reação. Em dois tubos (A e B) foram adicionados 444 µL de água, 450 µL do reagente *TaqMan 2× Universal PCR Master Mix* (No AmpErase UNG) (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) e 6 µL de $cDNA_A$ e de $cDNA_B$. Cem microlitros dessa mistura foram pipetados em cada fileira dos seus respectivos cartões (A e B). Os cartões foram centrifugados e selados com dispositivo fornecido pelo fabricante. A reação de amplificação foi feita no equipamento *QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). Os dados foram analisados no programa *SDS* v2.3 e os valores de *Ct* foram

calculados usando o software *RQ Manager* v1.2.1 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), com a seguinte programação: *baseline:* automático; *threshold*: 0,3. O ciclo em que a curva de amplificação ultrapassou o limiar de detecção da fluorescência (C*t*) foi determinado e utilizado para a quantificação. A expressão de miRNAs foi calculada pelo ΔC*t*, representado pela diferença de expressão entre o gene alvo e o controle endógeno de determinada amostra. Os níveis de expressão relativa dos miRNAs foram então obtidos pela utilização do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde ΔΔC*t* corresponde a diferença entre os ΔC*ts* das amostras estudadas, como mostrado a seguir (Gibson et al, 1996; Livak et al, 2001). Para o cálculo da expressão relativa foi utilizando o programa *ExpressionSuite for QuantStudio™ 6 & 7 Flex Real Time PCR System* (*Thermo Fisher Scientific*).

Normalização:

Δ*Ct* = Δ*Ct* do microRNA de interesse − Δ*Ct* do microRNA endógeno

Expressão relativa:

ΔΔ*Ct* = Δ*Ct* das amostras estudadas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	hsa-let-7a	hsa-let-7c	hsa-let-7d	hsa-let-7e	hsa-let-7f	hsa-let-7g	hsa-miR-1	hsa-miR-9	hsa-miR-10a	hsa-miR-10b	MammU6	MammU6	hsa-miR-15a	hsa-miR-15b	hsa-miR-16	hsa-miR-17	hsa-miR-18a	hsa-miR-18b	hsa-miR-19a	hsa-miR-19b	hsa-miR-20a	hsa-miR-20b	hsa-miR-21	hsa-miR-22
2	hsa-miR-23a	hsa-miR-23b	hsa-miR-24	hsa-miR-25	hsa-miR-26a	hsa-miR-26b	hsa-miR-27a	hsa-miR-27b	hsa-miR-28-3p	hsa-miR-28-5p	MammU6	MammU6	hsa-miR-29a	hsa-miR-29b	hsa-miR-29c	hsa-miR-30b	hsa-miR-30c	hsa-miR-31	hsa-miR-32	hsa-miR-33b	hsa-miR-34a	hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-92a	hsa-miR-93
3	hsa-miR-95	hsa-miR-96	hsa-miR-98	hsa-miR-99a	hsa-miR-99b	hsa-miR-100	hsa-miR-101	hsa-miR-103	hsa-miR-105	hsa-miR-106a	RNU44	hsa-miR-106b	hsa-miR-107	hsa-miR-122	hsa-miR-124	hsa-miR-125a-3p	hsa-miR-125a-5p	hsa-miR-125b	hsa-miR-126	hsa-miR-127-3p	hsa-miR-127-5p	hsa-miR-128	hsa-miR-129-3p	hsa-miR-129-5p
4	hsa-miR-130a	hsa-miR-130b	hsa-miR-132	hsa-miR-133a	hsa-miR-133b	hsa-miR-134	hsa-miR-135a	hsa-miR-135b	hsa-miR-136	hsa-miR-137	hsa-miR-138	hsa-miR-139-3p	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-140-3p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-141	hsa-miR-142-3p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-143	hsa-miR-145	hsa-miR-146a	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-147b
5	hsa-miR-148a	hsa-miR-148b	hsa-miR-149	hsa-miR-150	hsa-miR-152	hsa-miR-153	hsa-miR-154	hsa-miR-181a	hsa-miR-181c	hsa-miR-182	RNU48	hsa-miR-183	hsa-miR-184	hsa-miR-185	hsa-miR-186	hsa-miR-187	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-190	hsa-miR-191	hsa-miR-192	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-193b	hsa-miR-194
6	hsa-miR-195	hsa-miR-196b	hsa-miR-197	hsa-miR-198	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-200a	hsa-miR-200b	hsa-miR-200c	hsa-miR-202	hsa-miR-203	hsa-miR-204	hsa-miR-205	hsa-miR-208b	hsa-miR-210	hsa-miR-214	hsa-miR-215	hsa-miR-216a	hsa-miR-216b	hsa-miR-217	hsa-miR-218	hsa-miR-219-5p	hsa-miR-221
7	hsa-miR-222	hsa-miR-223	hsa-miR-224	hsa-miR-296-3p	hsa-miR-296-5p	hsa-miR-299-3p	hsa-miR-299-5p	hsa-miR-301a	hsa-miR-301b	hsa-miR-302a	ath-miR159a	hsa-miR-302b	hsa-miR-302c	hsa-miR-320	hsa-miR-323-3p	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-324-5p	hsa-miR-326	hsa-miR-328	hsa-miR-329	hsa-miR-330-3p	hsa-miR-330-5p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-331-5p
8	hsa-miR-335	hsa-miR-337-5p	hsa-miR-338-3p	hsa-miR-339-3p	hsa-miR-339-5p	hsa-miR-340	hsa-miR-155	hsa-let-7b	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-345	hsa-miR-361-5p	hsa-miR-362-3p	hsa-miR-362-5p	hsa-miR-363	hsa-miR-365	hsa-miR-367	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-370	hsa-miR-371-3p	hsa-miR-372	hsa-miR-373	hsa-miR-374a
9	hsa-miR-374b	hsa-miR-375	hsa-miR-376a	hsa-miR-376b	hsa-miR-377	hsa-miR-379	hsa-miR-380	hsa-miR-381	hsa-miR-382	hsa-miR-383	hsa-miR-409-5p	hsa-miR-410	hsa-miR-411	hsa-miR-422a	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-424	hsa-miR-425	hsa-miR-429	hsa-miR-431	hsa-miR-433	hsa-miR-449a	hsa-miR-449b	hsa-miR-450a	hsa-miR-450b-3p
10	hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-451	hsa-miR-452	hsa-miR-453	hsa-miR-454	hsa-miR-455-3p	hsa-miR-455-5p	hsa-miR-483-5p	hsa-miR-484	hsa-miR-485-3p	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-486-3p	hsa-miR-486-5p	hsa-miR-487a	hsa-miR-487b	hsa-miR-488	hsa-miR-489	hsa-miR-490-3p	hsa-miR-491-3p	hsa-miR-491-5p	hsa-miR-493	hsa-miR-494	hsa-miR-495	hsa-miR-496
11	hsa-miR-499-3p	hsa-miR-499-5p	hsa-miR-500	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-501-5p	hsa-miR-502-3p	hsa-miR-502-5p	hsa-miR-503	hsa-miR-504	hsa-miR-505	hsa-miR-507	hsa-miR-508-3p	hsa-miR-508-5p	hsa-miR-509-5p	hsa-miR-510	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-512-5p	hsa-miR-513-5p	hsa-miR-515-3p	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-516a-5p	hsa-miR-516b	hsa-miR-517a	hsa-miR-517c
12	hsa-miR-518a-3p	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-518b	hsa-miR-518c	hsa-miR-518d-3p	hsa-miR-518d-5p	hsa-miR-518e	hsa-miR-518f	hsa-miR-519a	hsa-miR-519d	hsa-miR-519e	hsa-miR-520a-3p	hsa-miR-520a-5p	hsa-miR-520d-5p	hsa-miR-520g	hsa-miR-521	hsa-miR-522	hsa-miR-523	hsa-miR-524-5p	hsa-miR-525-3p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-526b	hsa-miR-532-3p	hsa-miR-532-5p
13	hsa-miR-539	hsa-miR-541	hsa-miR-542-3p	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-544	hsa-miR-545	hsa-miR-548a-3p	hsa-miR-548a-5p	hsa-miR-548b-3p	hsa-miR-548b-5p	hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-548c-5p	hsa-miR-548d-3p	hsa-miR-548d-5p	hsa-miR-551b	hsa-miR-556-3p	hsa-miR-556-5p	hsa-miR-561	hsa-miR-570	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-576-3p	hsa-miR-576-5p	hsa-miR-579	hsa-miR-582-3p
14	hsa-miR-582-5p	hsa-miR-589	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-597	hsa-miR-598	hsa-miR-615-3p	hsa-miR-615-5p	hsa-miR-616	hsa-miR-618	hsa-miR-624	hsa-miR-625	hsa-miR-627	hsa-miR-628-5p	hsa-miR-629	hsa-miR-636	hsa-miR-642	hsa-miR-651	hsa-miR-652	hsa-miR-653	hsa-miR-654-3p	hsa-miR-654-5p	hsa-miR-655	hsa-miR-660	hsa-miR-671-3p
15	hsa-miR-672	hsa-miR-674	hsa-miR-708	hsa-miR-744	hsa-miR-758	hsa-miR-871	hsa-miR-872	hsa-miR-873	hsa-miR-874	hsa-miR-875-3p	hsa-miR-876-3p	hsa-miR-876-5p	hsa-miR-885-3p	hsa-miR-885-5p	hsa-miR-886-3p	hsa-miR-886-5p	hsa-miR-887	hsa-miR-888	hsa-miR-889	hsa-miR-890	hsa-miR-891a	hsa-miR-891b	hsa-miR-892a	hsa-miR-147
16	hsa-miR-208	hsa-miR-211	hsa-miR-212	hsa-miR-219-1-3p	hsa-miR-219-2-3p	hsa-miR-220	hsa-miR-220b	hsa-miR-220c	hsa-miR-298	hsa-miR-325	hsa-miR-346	hsa-miR-376c	hsa-miR-384	hsa-miR-412	hsa-miR-448	hsa-miR-492	hsa-miR-506	hsa-miR-509-3-5p	hsa-miR-511	hsa-miR-517b	hsa-miR-519c-3p	hsa-miR-520b	hsa-miR-520e	hsa-miR-520f

Figura 8. Representação esquemática do Painel *TLDA A* destacando miRNAs desregulados detectados em amostras de infectados por HTLV-1 reportados previamente na literatura. hsa: *Homo sapiens*; MammamU6: controle endógeno; ath-miR159a: controle negativo. Em destaque estão miRNAs desregulados detectados em estudos previamente realizados com pacientes infectados por HTLV-1. Os poços em vermelho escuro representam miRNAs superexpressos em casos de ATL e em vermelho claro, os miRNAs subexpressos. Os poços em azul escuro representam miRNAs superexpressos em casos de HAM/TSP e em azul claro, os miRNAs subexpressos.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	hsa-miR-30a*	hsa-miR-30e*	hsa-miR-34b*	hsa-miR-126*	hsa-miR-154*	hsa-miR-182*	hsa-miR-181a*	hsa-miR-302c*	hsa-miR-373*	hsa-miR-378*	MammU6	MammU6	hsa-miR-380*	hsa-miR-200a*	hsa-miR-432*	hsa-miR-493*	hsa-miR-500*	hsa-miR-488*	hsa-miR-517*	hsa-miR-518c*	hsa-miR-519e*	hsa-let-7d*	hsa-miR-363*	hsa-miR-7-1*
2	hsa-miR-589*	hsa-miR-550*	hsa-miR-593*	hsa-miR-624*	hsa-miR-629*	hsa-miR-616*	hsa-miR-29c*	hsa-miR-454*	hsa-miR-505*	hsa-miR-221*	MammU6	MammU6	hsa-miR-222*	hsa-miR-223*	hsa-miR-136*	hsa-miR-185*	hsa-miR-186*	hsa-miR-195*	hsa-miR-30c-1*	hsa-miR-30c-2*	hsa-miR-32*	hsa-miR-130b*	hsa-miR-26a-2*	hsa-let-7g*
3	hsa-miR-302b*	hsa-miR-302d*	hsa-miR-367*	hsa-miR-374a*	hsa-miR-23b*	hsa-miR-376a*	hsa-miR-377*	hsa-miR-30b*	hsa-miR-122*	hsa-miR-130a*	RNU48	RNU48	hsa-miR-132*	hsa-miR-379*	hsa-miR-148a*	hsa-miR-33a*	hsa-miR-92a-1*	hsa-miR-92a-2*	hsa-miR-93*	hsa-miR-96*	hsa-miR-99a*	hsa-miR-100*	hsa-miR-101*	hsa-miR-138-2*
4	hsa-miR-141*	hsa-miR-143*	hsa-miR-144*	hsa-miR-145*	hsa-miR-125b-2*	hsa-miR-135b*	hsa-miR-148b*	hsa-miR-138-1*	hsa-miR-146a*	hsa-miR-149*	RNU48	RNU48	hsa-miR-29b-1*	hsa-miR-29b-2*	hsa-miR-105*	hsa-miR-106a*	hsa-miR-16-2*	hsa-let-7i*	hsa-miR-15b*	hsa-miR-27b*	hsa-miR-335*	hsa-miR-99b*	hsa-miR-124*	hsa-miR-541*
5	hsa-miR-888*	hsa-miR-9*	hsa-miR-135a*	hsa-miR-411*	hsa-miR-340*	hsa-miR-545*	hsa-miR-183*	hsa-miR-192*	hsa-miR-200b*	hsa-miR-200c*	RNU44	RNU44	hsa-miR-155*	hsa-miR-10a*	hsa-miR-214*	hsa-miR-218-2*	hsa-miR-22*	hsa-miR-425*	hsa-miR-30d*	hsa-let-7a*	hsa-miR-424*	hsa-miR-18b*	hsa-miR-20b*	hsa-miR-431*
6	hsa-miR-7-2*	hsa-miR-10b*	hsa-miR-34a*	hsa-miR-181a-2*	hsa-miR-744*	hsa-miR-452*	hsa-miR-181c*	hsa-miR-708*	hsa-miR-92b*	hsa-miR-551b*	RNU44	RNU44	hsa-miR-202*	hsa-miR-193b*	hsa-miR-497*	hsa-miR-518e*	hsa-miR-125b-1*	hsa-miR-194*	hsa-miR-106b*	hsa-miR-302a*	hsa-miR-526b*	hsa-miR-518f*	hsa-miR-374b*	hsa-let-7b*
7	hsa-let-7e*	hsa-let-7f-1*	hsa-let-7f-2*	hsa-miR-15a*	hsa-miR-16-1*	hsa-miR-17*	hsa-miR-18a*	hsa-miR-19a*	hsa-miR-19b-1*	hsa-miR-19b-2*	RNU24	RNU24	hsa-miR-625*	hsa-miR-20a*	hsa-miR-21*	hsa-miR-23a*	hsa-miR-24-1*	hsa-miR-25*	hsa-miR-26a-1*	hsa-miR-26b*	hsa-miR-27a*	hsa-miR-29a*	hsa-miR-944	hsa-miR-943
8	hsa-miR-942	hsa-miR-941	hsa-miR-939	hsa-miR-938	hsa-miR-937	hsa-miR-936	hsa-miR-892b	hsa-miR-877	hsa-miR-875-5p	hsa-miR-770-5p	RNU24	RNU24	hsa-miR-760	hsa-miR-661	hsa-miR-659	hsa-miR-643	hsa-miR-638	hsa-miR-632	hsa-miR-630	hsa-miR-619	hsa-miR-617	hsa-miR-612	hsa-miR-610	hsa-miR-603
9	hsa-miR-601	hsa-miR-595	hsa-miR-593	hsa-miR-592	hsa-miR-587	hsa-miR-586	hsa-miR-585	hsa-miR-583	hsa-miR-575	hsa-miR-573	RNU43	RNU43	RNU6B	RNU6B	hsa-miR-569	hsa-miR-567	hsa-miR-565	hsa-miR-564	hsa-miR-563	hsa-miR-558	hsa-miR-557	hsa-miR-555	hsa-miR-554	hsa-miR-553
10	hsa-miR-552	hsa-miR-551a	hsa-miR-550	hsa-miR-549	hsa-miR-543	hsa-miR-520h	hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-516a-3p	hsa-miR-513-3p	hsa-miR-509-3p	RNU43	RNU43	RNU6B	RNU6B	ath-miR159a	hsa-miR-498	hsa-miR-378	hsa-miR-337-3p	hsa-miR-30e	hsa-miR-30a	hsa-miR-206	hsa-miR-190b	hsa-miR-188-5p	hsa-miR-151-3p
11	hsa-miR-935	hsa-miR-934	hsa-miR-933	hsa-miR-924	hsa-miR-923	hsa-miR-922	hsa-miR-921	hsa-miR-920	hsa-miR-801	hsa-miR-769-5p	hsa-miR-769-3p	hsa-miR-768-3p	hsa-miR-767-5p	hsa-miR-767-3p	hsa-miR-766	hsa-miR-7	hsa-miR-675	hsa-miR-668	hsa-miR-662	hsa-miR-658	hsa-miR-657	hsa-miR-656	hsa-miR-650	hsa-miR-649
12	hsa-miR-935	hsa-miR-934	hsa-miR-933	hsa-miR-924	hsa-miR-923	hsa-miR-922	hsa-miR-921	hsa-miR-920	hsa-miR-801	hsa-miR-769-5p	hsa-miR-769-3p	hsa-miR-768-3p	hsa-miR-767-5p	hsa-miR-767-3p	hsa-miR-766	hsa-miR-7	hsa-miR-675	hsa-miR-668	hsa-miR-662	hsa-miR-658	hsa-miR-657	hsa-miR-656	hsa-miR-650	hsa-miR-649
13	hsa-miR-648	hsa-miR-647	hsa-miR-646	hsa-miR-645	hsa-miR-644	hsa-miR-641	hsa-miR-640	hsa-miR-639	hsa-miR-637	hsa-miR-635	hsa-miR-634	hsa-miR-633	hsa-miR-631	hsa-miR-628-3p	hsa-miR-626	hsa-miR-623	hsa-miR-622	hsa-miR-621	hsa-miR-614	hsa-miR-613	hsa-miR-609	hsa-miR-608	hsa-miR-607	hsa-miR-606
14	hsa-miR-605	hsa-miR-604	hsa-miR-600	hsa-miR-599	hsa-miR-596	hsa-miR-591	hsa-miR-588	hsa-miR-584	hsa-miR-581	hsa-miR-580	hsa-miR-578	hsa-miR-572	hsa-miR-571	hsa-miR-566	hsa-miR-562	hsa-miR-559	hsa-miR-524-3p	hsa-miR-519b-3p	hsa-miR-497	hsa-miR-432	hsa-miR-409-3p	hsa-miR-361-3p	hsa-miR-30d	hsa-miR-302d
15	hsa-miR-648	hsa-miR-647	hsa-miR-646	hsa-miR-645	hsa-miR-644	hsa-miR-641	hsa-miR-640	hsa-miR-639	hsa-miR-637	hsa-miR-635	hsa-miR-634	hsa-miR-633	hsa-miR-631	hsa-miR-628-3p	hsa-miR-626	hsa-miR-623	hsa-miR-622	hsa-miR-621	hsa-miR-614	hsa-miR-613	hsa-miR-609	hsa-miR-608	hsa-miR-607	hsa-miR-606
16	hsa-miR-605	hsa-miR-604	hsa-miR-600	hsa-miR-599	hsa-miR-596	hsa-miR-591	hsa-miR-588	hsa-miR-584	hsa-miR-581	hsa-miR-580	hsa-miR-578	hsa-miR-572	hsa-miR-571	hsa-miR-566	hsa-miR-562	hsa-miR-559	hsa-miR-524-3p	hsa-miR-519b-3p	hsa-miR-497	hsa-miR-432	hsa-miR-409-3p	hsa-miR-361-3p	hsa-miR-30d	hsa-miR-302d

Figura 9. Representação esquemática do Painel *TLD B* destacando miRNAs desregulados detectados em amostras de infectados por HTLV-1 reportados previamente na literatura. hsa: *Homo sapiens*; MammamU6: controle endógeno; ath-miR159a: controle negativo. Em destaque estão miRNAs desregulados detectados em estudos previamente realizados com pacientes infectados por HTLV-1. Os poços em vermelho escuro representam miRNAs superexpressos em casos de ATL e em vermelho claro, os miRNAs subexpressos. Os poços em azul escuro representam miRNAs superexpressos em casos de HAM/TSP e em azul claro, os miRNAs subexpressos.

3.6.4.4. Ferramentas estatísticas para análise dos resultados

As análises estatísticas do perfil de expressão de miRNAs foram feitas utilizando o programa *ExpressionSuite for QuantStudio™ 6 & 7 Flex Real Time PCR System* (*Thermo Fisher Scientific*) pelo método de normalização global, seguido do teste FDR (do inglês, *False Discovery Rate*) (Benjamini e Hochberg, 1995; Smyth, 2004), sendo considerada a significância de $p<0,05$. O agrupamento hierárquico foi feito com base no desvio padrão, utilizando-se a correlação de *Pearson* e Z *score*.

As análises de correlação entre a expressão e os demais testes laboratoriais avaliados foram feitas, considerando o valor de ΔCt, utilizando-se o *software GraphPad Prism 7.0* (*GraphPad Software*, La Jolla, CA, EUA), sendo $p<0,05$. Para as análises de correlação, foi utilizado o teste de *Spearman* com intervalo de confiança de 95%, cruzando os valores de ΔCt dos miRNAs com os resultados dos demais parâmetros laboratoriais avaliados, sendo considerado $p<0,05$.

3.6.4.5. Análise ROC

O programa *GraphPad Prism*®, versão 7.0. (San Diego, CA) foi usado para a construção das curvas ROC que ajustou a intensidade de expressão dos miRNAs para o ponto em que havia maior sensibilidade e especificidade, simultaneamente. A construção das curvas para avaliação da expresssão de miRNAs considerou os valores de ΔCt em relação à sensibilidade e especificidade.

3.6.4.6. Análises bioinformáticas

Programas computacionais (algoritmos) vêm sendo bastante utilizados na análise dos dados gerados em pesquisas relacionadas à expressão de miRNAs, uma vez que realizam uma triagem dos possíveis RNAm alvos dos miRNAs detectados (Bentwich, 2005; Mazière e Enright, 2007). Essa predição de alvos por meio de ferramentas de bioinformática é possível pela análise de particularidades que o miRNA apresenta ao se ligar ao seu alvo, como a *seed region* de cada miRNA e a energia livre (Mfe) do duplex formado entre o miRNA e seu RNAm alvo (Doench e Sharp, 2004; Kertesz et al., 2007).

Os dados de expressão diferencial de miRNAs foram obtidos utilizando-se o programa *ExpressionSuite for QuantStudio™ 6 & 7 Flex Real Time PCR System* (*Thermo Fisher Scientific*) para determinar a expressão diferencial dos miRNAs. Resumidamente, os dados de amplificação de cada placa foram importados para o *ExpressionSuite* e usando-se a configuração padrão, foram avaliados visualmente para detecção de eventuais *flags* e normalizados com base nos valores obtidos do controle endógeno. Em seguida, foi realizado o agrupamento hierárquico para obtenção de *heatmaps* e determinação dos perfis de expressão de miRNAs.

Uma vez identificados os possíveis RNAm alvos pelo programa *ExpressionSuite,* esses alvos foram submetidos à análise *in silico* do perfil de expressão de miRNAs encontrado, utilizando o programa *Ingenuity Pathway Analysis v8.0-2602* (*IPA, Ingenuity® Systems*, Redwood City, CA, EUA - www.ingenuity.com). O IPA contém a ferramenta *Core Analysis*, que revela a(s) via(s) de sinalização na(s) qual(is) os miRNAs detectados estão envolvidos.

Ainda nessa funcionalidade, alguns comandos poderão revelar diversas características associadas à expressão dos miRNAs detectados, tais como: doenças, funções moleculares e sistemas fisiológicos potencialmente relacionados.

Uma vez identificados os perfis de miRNAs diferenciais, os dados foram importados para programa *Ingenuity Pathway Analysis v8.0-2602* (*IPA, Ingenuity® Systems*, Redwood City, CA, EUA - www.ingenuity.com) que permitiu examinar interações miRNA-RNAm preditos e/ou demonstrados experimentalmente, priorizando alvos baseados no contexto biológico relevante (como por exemplo, no atual estudo, doenças infecciosas), demonstrando as interações moleculares entre o miRNA e seu RNAm alvo e o impacto biológico, relacionando, assim, como vias de sinalização enriquecidas.

Primeiramente, foi feita uma análise de predição de alvos potenciais dos miRNAs e a lista gerada passou por um processo de filtragem que utiliza os bancos de dados de alvos de miRNAs *TarBase* (alvos que foram determinados experimentalmente) e o *TargetScan* (alvos preditos), no qual foi possível, selecionar: o nível de confiança (se foi testado experimentalmente ou não e se a predição possui alta ou baixa confiabilidade), o contexto biológico, tipo de célula e doença. Todas as análises feitas foram com base em um lista de RNAm alvo testados experimentalmente ou altamente preditos como alvos. As análises foram realizadas com as bases de dados disponíveis em julho de 2016.

3.7. Aspectos éticos

O protocolo de estudo seguiu as recomendações do Conselho Nacional de Saúde para pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução n°466/2012 de 13 de junho de 2013). A anuência de participantes foi voluntária e expressa pela assinatura de termos de consentimento livre e esclarecido (TCLE), específicos para o grupo de pacientes infectados por HTLV-1 (ASS e HAM) (**Anexo 2**) e para o grupo controle (**Anexo 3**). Adicionalmente foi preservado o anonimato dos sujeitos da pesquisa e a confidencialidade no manejo das informações durante toda a execução da investigação. O protocolo de pesquisa deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP sob números *on-line* 855/08 (**Anexo 4**) e 12144/14 (**Anexo 5**).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da população de estudo

Os grupos de indivíduos infectados por HTLV-1 e controles foram analisados quanto à idade e sexo. No grupo CN, dos 14 indivíduos, 10 eram do sexo feminino (71,4%) e quatro do sexo masculino (28,6%), enquanto que, dos 19 portadores ASS, 13 eram do sexo feminino (68,4%) e seis do sexo masculino (31,6%) e dos 17 pacientes com HAM/TSP, 11 eram do sexo feminino (64,7%) e seis do sexo masculino (35,3%). Em geral, dos 50 indivíduos infectados pelo HTLV-1 incluídos neste estudo, 34 eram do sexo feminino (68%) e 16 do sexo masculino (32%). As idades nos três grupos variaram de 21 a 75 anos, com 78% dos indivíduos na faixa etária acima dos 50 anos (**Tabela 1**). A média de idade dos indivíduos que compuseram o grupo CN, ASS e HAM/TSP foi de 53 (22-69 anos), 59 (38-75 anos) e 51 anos (21-72 anos), respectivamente.

Tabela 1. Caracterização demográfica dos indivíduos sadios e infectados pelo HTLV-1 em relação ao sexo e idade.

Dados demográficos	CN n (%)	ASS n (%)	HAM n (%)
Sexo			
Feminino	10 (71,4)	13 (68,4)	11 (64,7)
Masculino	4 (28,6)	6 (31,6)	6 (35,3)
Idade			
18-29 anos	2 (14,3)	-	3 (17,6)
30-39 anos	2 (14,3)	1 (5,3)	1 (5,9)
40-49 anos	1 (7,1)	2 (10,5)	1 (5,9)
>50 anos	9 (64,3)	16 (84,2)	12 (70,6)
Total	**14**	**19**	**17**

Legenda. CN: indivíduos sadios; ASS: portadores assintomáticos; HAM: pacientes com HAM/TSP.

No grupo HAM, foi possível obter-se dados clínicos detalhados de 14 (82%) pacientes. Na maioria desses observaram-se sinais de doença crônica, com tempo mediano de sintomas de 13 anos (variando de 3 a 25 anos). As alterações neurológicas mais frequentemente relatadas ou observadas à avaliação clínica foram: fraqueza muscular sob forma de paraparesia crural (93%), bexiga neurogênica (71%), dor neuropática (64%) e obstipação intestinal crônica (57%).

4.2. Contagem e avaliação da pureza das células T CD4+ e T CD8+

As células foram avaliadas pelos resultados de hemograma, contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+ e razão CD4/CD8. A contagem de leucócitos variou entre 3.563 e 11.679 células/mm^3 e a maioria (95%) das amostras apresentou-se dentro do valor de referência (4.000 a 11.000 células/mm^3), exceto duas (ASS-57 e HAM-77) que apresentaram leucopenia.

A contagem de células T CD4+ variou de 845 a 3.724 células/mm^3 e as células T CD8+ de 334 a 3.051 células/mm^3. Os valores para a razão CD4+/CD8+ apresentaram-se entre 0,5 a 4,8, sendo que em sete amostras apresentaram valores inferiores a 1,2 (ASS-4, -21, -27, HAM-36, -51, CN-60 e -62).

As células CD4+ e CD8+ foram isoladas por coluna imunomagnética e a pureza destas foi avaliada por citometria de fluxo. Apenas as amostras que apresentaram pureza acima de 85% foram incluídas no estudo.

Os valores obtidos da contagem dos leucócitos totais e a razão de células CD4+/CD8+ foram comparados entre os grupos para observar se haviam diferenças entre os indivíduos controle e os infectados por HTLV-1. Nenhuma diferença estatística foi demonstrada após avaliação estatística (**Figura 10**).

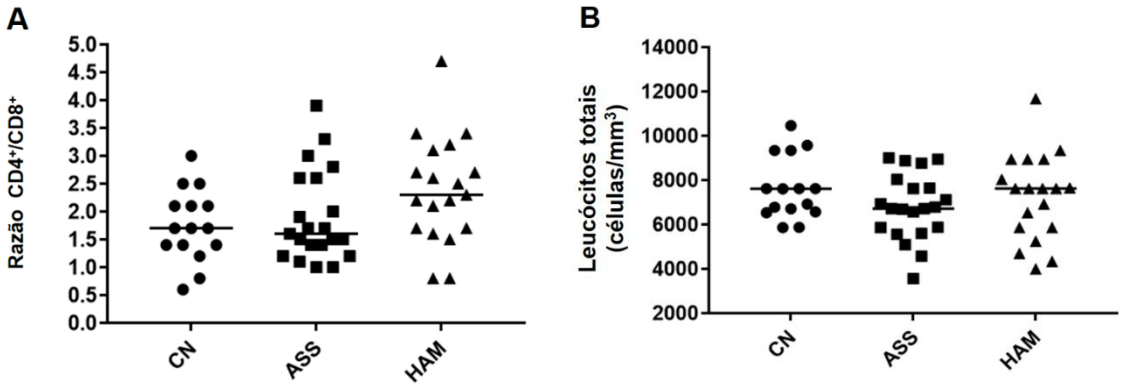


Figura 10. Caracterização linfocitária dos grupos controle, portadores assintomáticos e pacientes com HAM/TSP. **A.** Comparação entre a razão obtida dos linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ e os grupos. **B.** Comparação entre a contagem global de leucócitos e os grupos. Utilizou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, seguido do pós-teste de *Dunn*. Os valores de *p* obtidos não foram significativos (p=0,0625 e p=0,3947, respectivamente).

4.3. Quantificação da carga proviral de HTLV-1

A determinação da CPV foi realizada em 45 indivíduos infectados por HTLV-1 (27 ASS e em 18 HAM). Verificou-se diferença estatisticamente significativa entre a CPV do grupo ASS (mediana = 16,02 cópias virais/10^3 células) e HAM (mediana = 101,49 cópias virais/10^3 células) (p=0,0002) (**Figura 11A**).

Quando analisada a CPV de forma desagregada, segundo a intensidade da mesma, foi demonstrado que a CPV do grupo HAM *vs.* CPV alta foi significativamente diferente da obervada no grupo de ASS *vs.* CPV baixa (p<0,0001) (**Figura 11B**).

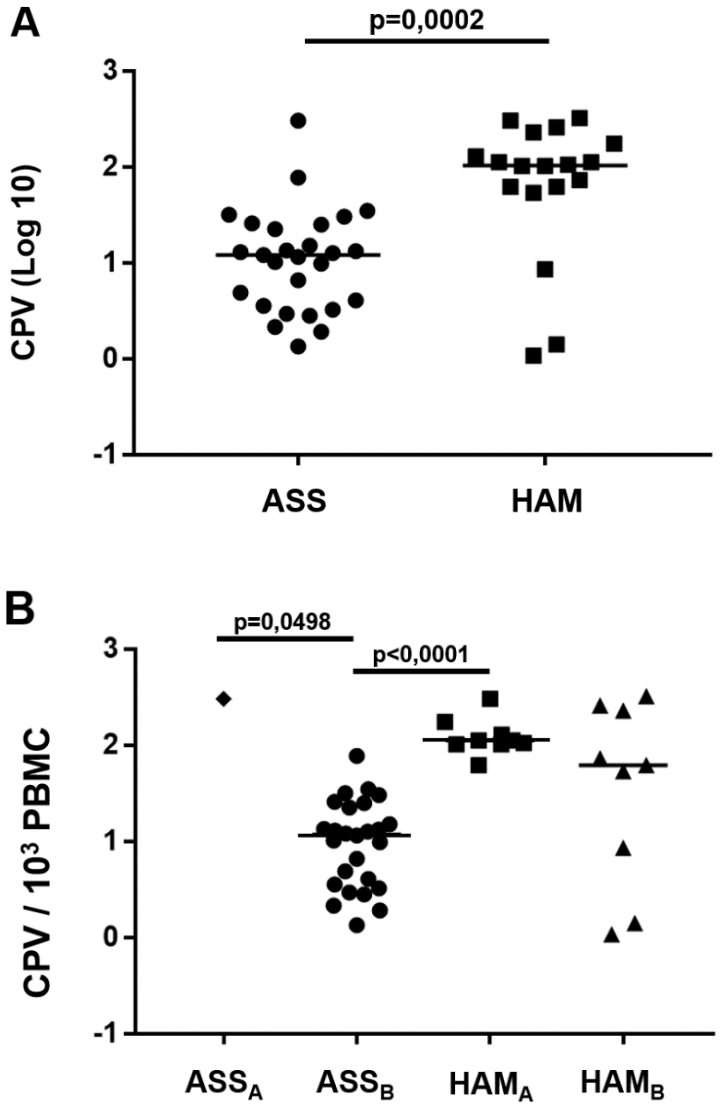


Figura 11. Distribuição da carga proviral entre os indivíduos assintomáticos e com HAM/TSP. **A.** O valor de *p* obtido pelo teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* foi significativo quando comparados os dois grupos (p=0,0002). **B.** Comparando a intensidade de carga proviral em cada e entre os grupos, os valores de *p* obtidos pelo teste não-paramétrico de *Kruskal-Wallis*, comparando múltiplos grupos, também foram significativos. CPV ASS (Baixa) *vs.* CPV HAM (Alta): p<0,0001. CPV ASS (Alta) *vs.* CPV ASS (Baixo): p=0,0498.

4.4. Determinação da expressão dos genes virais *tax* e *HBZ*

Das 45 amostras testadas, 25 (10 de portadores assintomáticos e 15 de pacientes com HAM/TSP) amplificaram pelo menos um dos genes estudados. A expressão de RNAm *tax* e *HBZ* foi detectada, simultaneamente, em oito (32%) amostras (ASS = 2 e HAM = 6), apenas expressão de RNAm *tax* em 14 (56%) (ASS 6 = e HAM = 8) e RNAm *HBZ* em 3 (12%) (ASS = 2 e HAM = 1) das amostras analisadas (**Figura 12**).

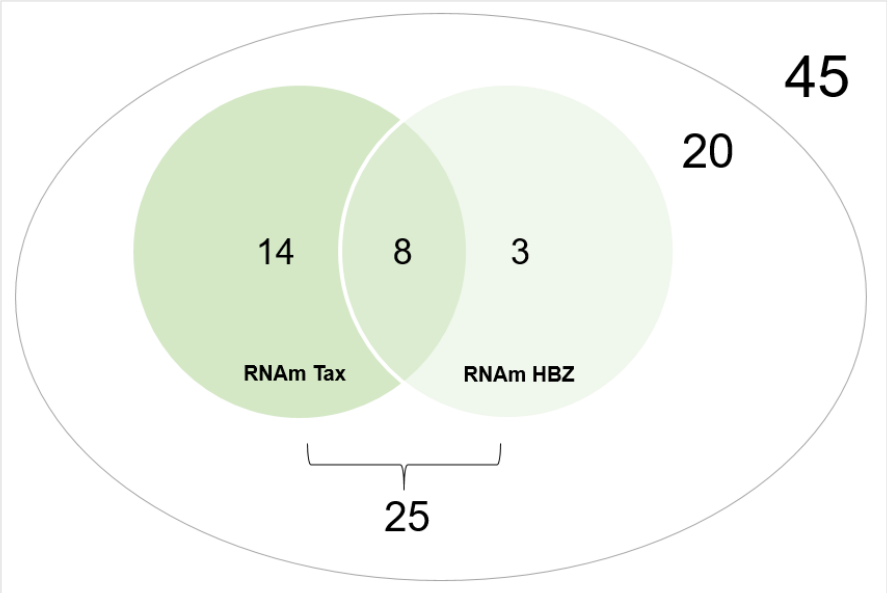


Figura 12. Distribuição do número de amostras que expressaram *tax* e/ou *HBZ* de HTLV-1 entre os indivíduos infectados por HTLV-1.

A correlação entre a expressão de RNAm Tax e de RNAm HBZ e a carga proviral mostrou que a intensidade de expressão de *tax* apresentou significativa correlação positiva com a carga proviral no conjunto das amostras analisadas (ASS + HAM) (r = 0,9129; p<0,0002), nos ASS (r = 0,8091; p=0,0094) e mais fortemente no grupo HAM (r = 0,9969; p<0,001). Por outro lado, observou-se

fraca correlação positiva entre a expressão de *HBZ* e a carga proviral no grupo ASS + HAM (r = 0,4592; *p*=0,0428), no ASS (r = 0,4573; *p*=0,0461) e no HAM (0,4916; *p*=0,0219). A expressão de RNAm de ambos os genes estudados também foi positivamente correlacionada, porém de modo distinto para o grupo ASS + HAM (r = 0,5579; *p*=0,0065), no ASS (r = 0,4522; p=0,0382), e no HAM (r = 0,7751; *p*=0,005) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Análise da correlação a expressão de RNAm Tax, RNAm HBZ e carga proviral de HTLV-1 em portadores assintomáticos e pacientes com HAM/TSP.

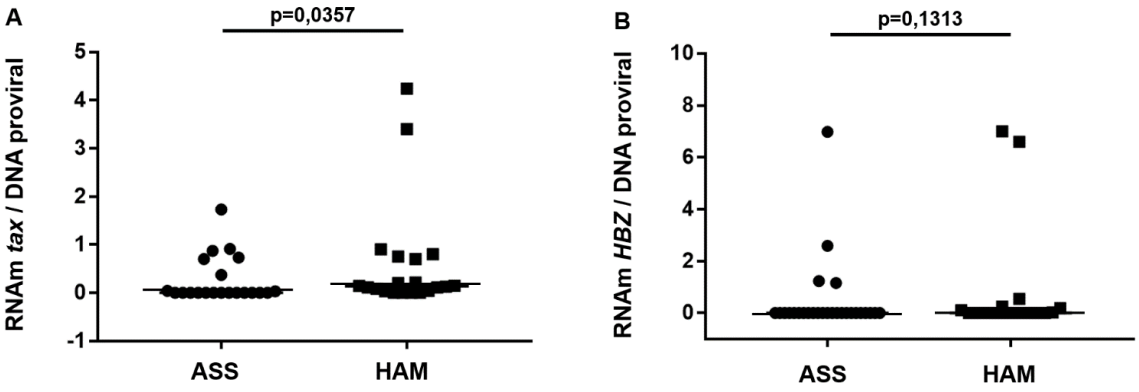
Grupos de indivíduos	RNAm	Correlação com	
		carga proviral	RNAm *HBZ*
ASS + HAM (n=45)	*tax*	r = 0,9129; *p*<0,0002	r = 0,5579; *p*=0,0065
	HBZ	r = 0,4592; *p*=0,0428	NA
ASS (n=27)	*tax*	r = 0,8091; *p*=0,0094	r = 0,4522; *p*=0,0382
	HBZ	r = 0,4573; *p*=0,0461	NA
HAM (n=18)	*tax*	r = 0,9969; *p*<0,0001	r = 0,7751; *p*=0,005
	HBZ	r = 0,4916; *p*=0,0219	NA

Legenda. NA: não se aplica. ASS: Grupo de portadores de HTLV-1 assintomáticos. HAM: Grupo de pacientes com HAM/TSP. As diferenças estatísticas foram calculadas, analisando o coeficiente de correlação de *Spearman*.

Ao se comparar a intensidade de expressão de genes virais entre os grupos ASS e HAM, após normalização com a CPV, demostrou-se que a expressão de *tax* foi significantemente maior no grupo HAM (p=0,0357). Em

contrapartida, não houve diferença significativa entre a expressão de *HBZ* entre os grupos analisados (p=0,1313) (**Figuras 13A e 13B**).

Diferenças na expressão de genes virais normalizadas com DNA proviral foram também avaliadas entre os grupos ASS e HAM, de forma desagregada, segundo a intensidade de CPV. Nessa análise foram comparadas as intensidades de expressão de *tax* em oito do grupo ASS (dois com CPV alta e seis com CPV baixa) e em 14 pacientes do grupo HAM (11 com CPV alta e três com CPV baixa) e de *HBZ* em quatro do grupo ASS (um com CPV alta e três com CPV baixa) e em sete do grupo HAM (seis com CPV alta e um com CPV baixa). Verificou-se que a intensidade de expressão de *tax* foi significativamente maior entre os indivíduos do grupo HAM e alta CPV, quando comparados à do grupo ASS com baixa CPV (p=0,0490). Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de *HBZ* normalizada pelo DNA proviral entre os subgrupos desagregados (**Figuras 13C e 13D**).



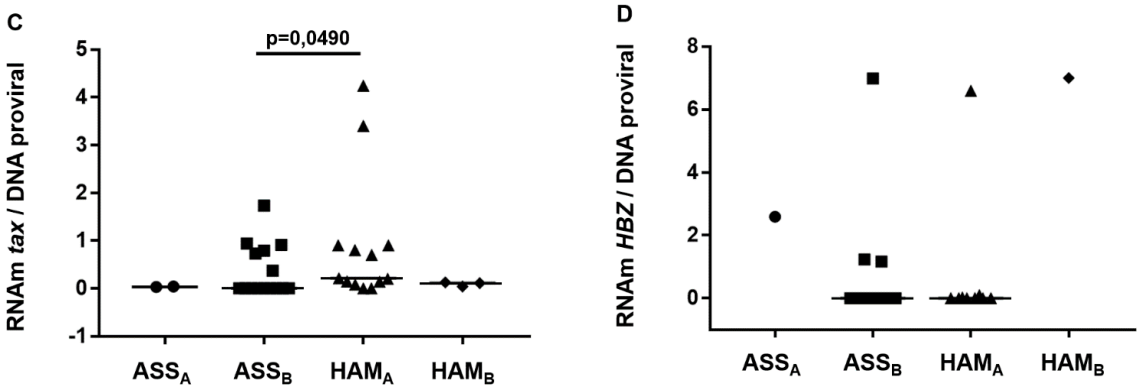


Figura 13. Expressão de *tax* e *HBZ* normalizadas com DNA proviral de HTLV-1. As diferenças estatísticas foram assinaladas, utilizando o teste não-paramétrico de *Mann-Whitney* (dois grupos) ou *Kruskal-Wallis* (múltiplos grupos), adotando-se um nível de significância $p \leq 0,05$.

Dos oito indivíduos infectados por HTLV-1 que expressaram, simultaneamente, RNAm Tax e RNAm HBZ (ASS=2 e HAM=6), a maioria (5/8) apresentou intensidade de expressão de *HBZ* mais alta do que a de *tax* (**Figura 14**).

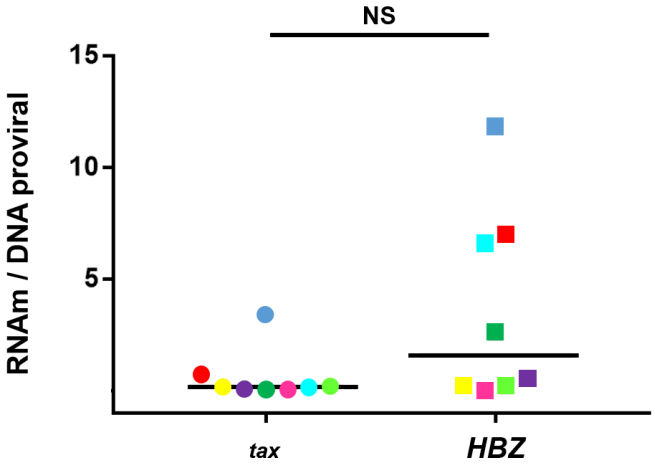


Figura 14. Expressão dos RNAm *tax* e *HBZ* normalizada por DNA proviral de HTLV-1 nas amostras que expressaram ambos os genes. Não houve diferença estatisticamente significante entre a de RNAm *tax* e RNAm *HBZ* (p=0,1304).

4.5. Determinação da expressão relativa de microRNAs

4.5.1. Seleção das amostras e extração de RNA

Para verificar a pureza das 50 amostras de RNA total (CN=14, ASS=19 e HAM=17) obtidas da extração de células T CD4+ e T CD8+ foram combinadas as análises das razões 260/280 e 260/230. Os resultados mostraram que o RNA extraído apresentou qualidade adequada, com valores médios da razão 260/280 = 1,9 e da razão 260/230 = 1,6.

4.5.2. Perfil de expressão de miRNAs em células T CD4+ e T CD8+ em indivíduos infectados por HTLV-1

Realizadas as reações de qPCR foi possível detectar amplificação de miRNAs em todas as placas analisadas, sendo que as placas A apresentaram número maior de miRNAs amplificados em relação ao número de miRNAs detectados nas placas B.

Após a qPCR, os dados obtidos foram normalizados (normalização global), permitindo que fosse feito o cálculo do *fold-change* pelo programa *ExpressionSuite for QuantStudio™ 6 & 7 Flex Real Time PCR System* (*Thermo Fisher Scientific*).

Considerando o nível de significância de 0,05, foram encontrados 10 microRNAs diferencialmente expressos, quando comparados os grupos HAM e ASS. No grupo HAM, foram identificados sete miRNAs, cujas expressões apresentaram aumento de pelo menos 1,5 vezes (hsa-miR-133a, -148a, -211, -

330, -369-5p, -486 e -889) (**Tabela 3A** e **Figura 15A**) e três miRNAs que apresentaram uma redução de expressão de pelo menos 1,5 vezes (hsa-miR-520b, -520e e hsa-miR-566) (**Tabela 3B** e **Figura 15A**).

Quando comparados ASS *vs.* CN, observou-se que no grupo ASS foram encontrados quatro miRNAs com aumento de expressão (hsa-miR-27a, -126a-3p, -320B, -520e) (**Tabela 4A** e **Figura 15B**), e 14 com redução de expressão (hsa-miR-135a, -139-5p, -211, -219a-1-3p, -302c, -381, -425-5p, -516-3p, -588, -598, -625, -627-5p, -589 e -1253) (**Tabela 4B** e **Figura 15B**), semelhantemente ao observado no grupo HAM. Estes, *versus* CN, apresentaram aumento da expressão de cinco miRNAs (hsa-miR-26a-2, -449b, -641, -708 e -938) e redução desta, em 10 miRNAs (hsa-miR-412, -518b, -548-5p, -573, -576-5p, -588, -598, -618, -627 e -1225-3p) (**Tabela 5A** e **Figura 15C**).

Tabela 3. Expressão relativa (*fold-change*) de miRNAs isolados de células T CD4+ e T CD8+ do grupo HAM, quando comparada à do grupo ASS.

microRNAs*	*fold-change*	P-valor	Localização genômica
A) miRNAs com *fold-change* de pelo menos 1,5 vezes no grupo HAM (*vs.* ASS)			
hsa-miR-369-5p	2,9	0,045	14q32.31
hsa-miR-211	2,7	0,020	15q13.3
hsa-miR-889	2,2	0,033	14q32.31
hsa-miR-133a	2,2	0,034	18q11.2
hsa-miR-486	1,7	0,048	8p11.21
hsa-miR-148a	1,7	0,050	7p15.2
hsa-miR-330	1,4	0,047	19q13.32
B) miRNAs com *fold-change* (negativo) de pelo menos 1,5 vezes no grupo HAM (*vs.* ASS)			
hsa-miR-520b	-1,7	0,050	Cromossomo 19
hsa-miR-566	-3,0	0,040	Cromossomo 3
hsa-miR-520e	-7,3	0,039	19q13.42

Legenda. * microRNAs diferencialmente expressos, considerando um nível de significância $p \leq 0,05$ quando comparados os grupos ASS e HAM.

Tabela 4. Expressão relativa (*fold-change*) de miRNAs isolados de células T CD4+ e T CD8+ do grupo ASS, quando comparada à do grupo CN.

microRNAs*	*fold-change*	P-valor	Localização genômica
A) miRNAs com *fold-change* de pelo menos 1,5 vezes no grupo ASS (*vs.* CN)			
hsa-miR-520e	11,4	0,015	19q13.42
hsa-miR-27a	5,4	0,021	19p13.13
hsa-miR-589	2,2	0,013	7p22.1
hsa-miR-320B	1,7	0,046	Cromossomo 1
B) miRNAs com *fold-change* (negativo) de pelo menos 1,5 vezes no grupo ASS (*vs.* CN)			
hsa-miR-625	-1,7	0,013	14q23.3
hsa-miR-139-5p	-1,8	0,038	11q13.4
hsa-miR-126a-3p	-2,5	0,032	9q34.3
hsa-miR-211	-2,5	0,035	15q13.3
hsa-miR-135a	-2,8	0,029	3p21.1
hsa-miR-598	-3,0	0,015	8p23.1
hsa-miR-219a-1-3p	-3,2	0,034	7q32.1
hsa-miR-381	-6,3	0,024	14q32.31
hsa-miR-425-5p	-9,9	0,048	3p21.31
hsa-miR-516-3p	-13,5	0,042	19q13.42
hsa-miR-302c	-14,5	0,018	4q25
hsa-miR-1253	-34,5	0,023	Cromossomo 17
hsa-miR-627	-40,0	0,050	15q15.1
hsa-miR-588	-58,8	0,007	6q22.32

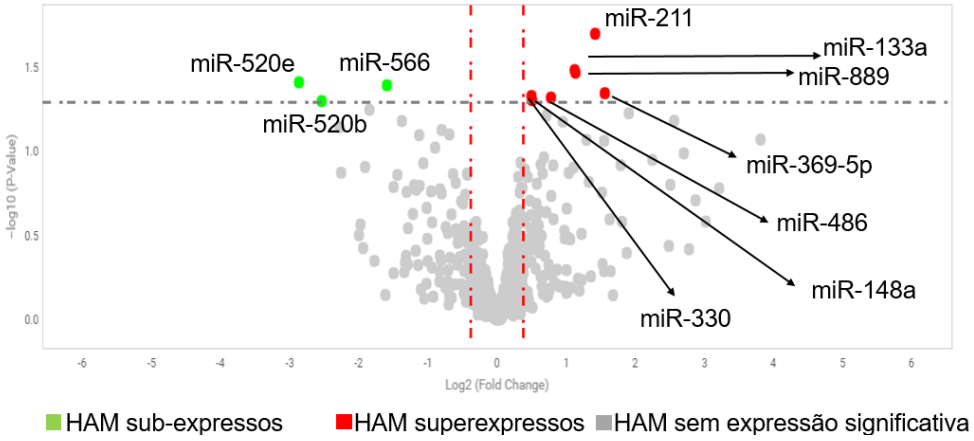
Legenda. * microRNAs diferencialmente expressos, considerando um nível de significância $p \leq 0,05$ quando comparados os grupos ASS e HAM. Realçados em vermelho, destacam-se os miRNAs detectados simultaneamente nos grupos estudados.

Tabela 5. Expressão relativa (*fold-change*) de miRNAs isolados de células T CD4+ e T CD8+ do grupo HAM, quando comparada à do grupo CN.

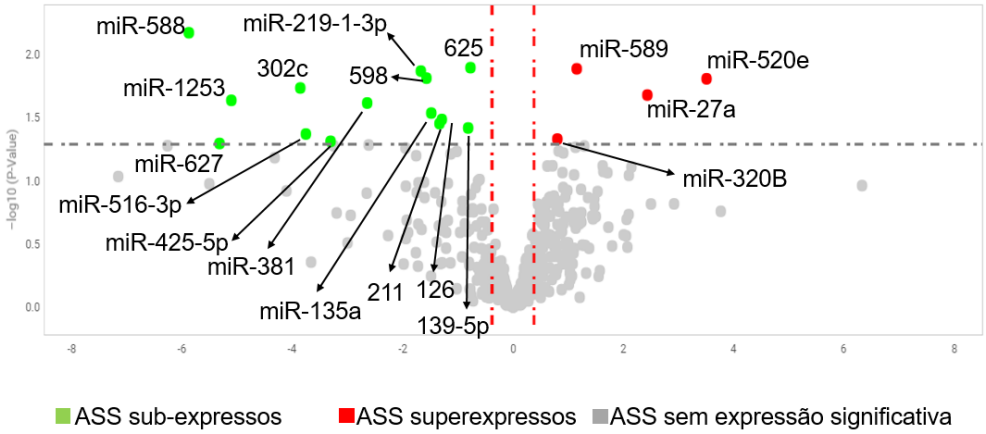
microRNAs*	*fold-change*	P-valor	Localização genômica
A) miRNAs com *fold-change* de pelo menos 1,5 vezes no grupo HAM (*vs.* CN)			
hsa-miR-641	551,7	0,034	19q13.2
hsa-miR-26a-2	39,3	0,040	12q14.1
hsa-miR-938	11,8	0,047	10p11.23
hsa-miR-449b	4,6	0,045	5q11.2
hsa-miR-708	4,0	0,029	11q14.1
B) miRNAs com *fold-change* (negativo) de pelo menos 1,5 vezes no grupo HAM (*vs.* CN)			
hsa-miR-598	-2,6	0,035	8p23.1
hsa-miR-576-5p	-2,8	0,024	Cromossomo 4
hsa-miR-548-5p	-2,8	0,042	Cromossomo 12
hsa-miR-573	-3,8	0,022	4p15.2
hsa-miR-518b	-4,1	0,037	19q13.42
hsa-miR-1225-3p	-7,8	0,036	16p13.3
hsa-miR-412	-55,6	0,014	14q32.31
hsa-miR-627	-66,7	0,045	15q15.1
hsa-miR-588	-71,4	0,034	6q22.32
hsa-miR-618	-166,7	0,044	12q21.31

Legenda. * microRNAs diferencialmente expressos, considerando um nível de significância $p \leq 0,05$ quando comparados os grupos ASS e HAM. Realçados em vermelho, destacam-se os miRNAs detectados simultaneamente nos grupos estudados.

A) HAM *vs.* ASS



B) ASS *vs.* CN



C) HAM *vs.* CN

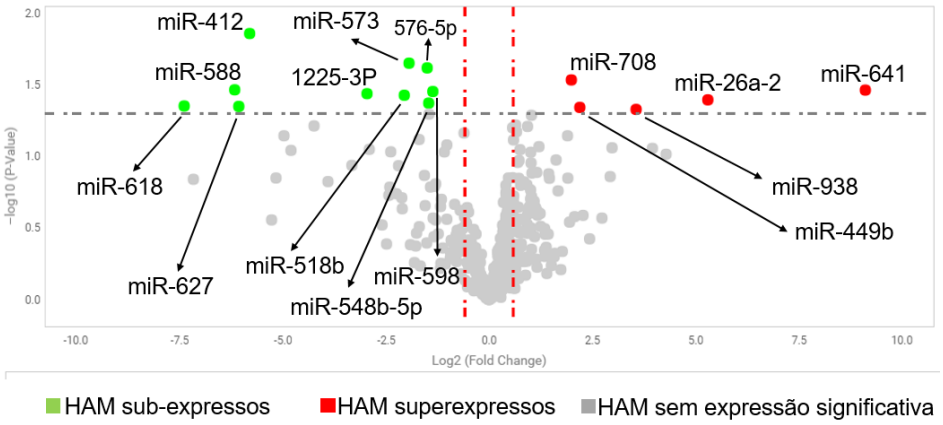


Figura 15. *Volcano plot* da expressão relativa de miRNAs detectados em células T CD4+ e T CD8+ de portadores assintomáticos de HTLV-1 e de pacientes com

HAM/TSP por RT-qPCR. **A.** microRNAs significativamente sub- e superexpressos no grupo HAM (*vs.* ASS). **B.** microRNAs sub- e superexpressos no grupo ASS (*vs.* CN). **C.** microRNAs sub- e superexpressos no grupo HAM (*vs.* CN). As diferenças estatísticas foram calculadas, empregando-se o programa *ExpressionSuite* v. 1.0 (Thermo Fisher Scientific), que integra os algoritmos *miRanda, TargetScan, PicTar* e *DIANA-microT* e utiliza o método comparativo de *Ct* ($\Delta\Delta Ct$) para quantificar a expressão relativa em meio a um grande número de miRNAs e de amostras. Os gráficos comparam o valor de *p*, adotando significância de 0,05 com a expressão relativa (*fold-change* > 1,5) e fornecendo os resultados em escala log10 e log2, respectivamente.

Analisando em detalhes os miRNAs desregulados no grupo HAM (**Figuras 16** e **17**), verificou-se que a intensidade de expressão dos miR-520e (**Figura 17B**) e hsa-miR-566 (**Figura 17C**) foi significativamente maior no grupo ASS (*vs.* HAM) (p=0,015 e p=0,048, respectivamente), e ainda, que o miR-520e (**Figura 17A**) apresentou expressão significativamente diminuída, quando comparada ao grupo CN (p=0,003). Os demais miRNAs desregulados apresentaram expressão significativamente maior no grupo HAM (*vs.* ASS). Adicionalmente, a expressão do miR-889 (**Figura 17J**) foi significativamente maior no grupo HAM (*vs.* CN) (p=0,011).

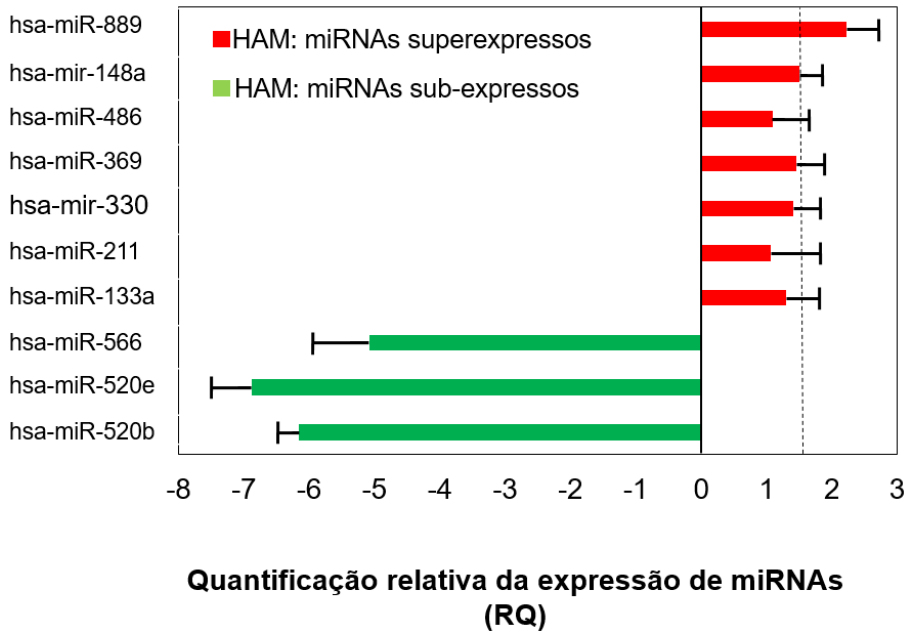
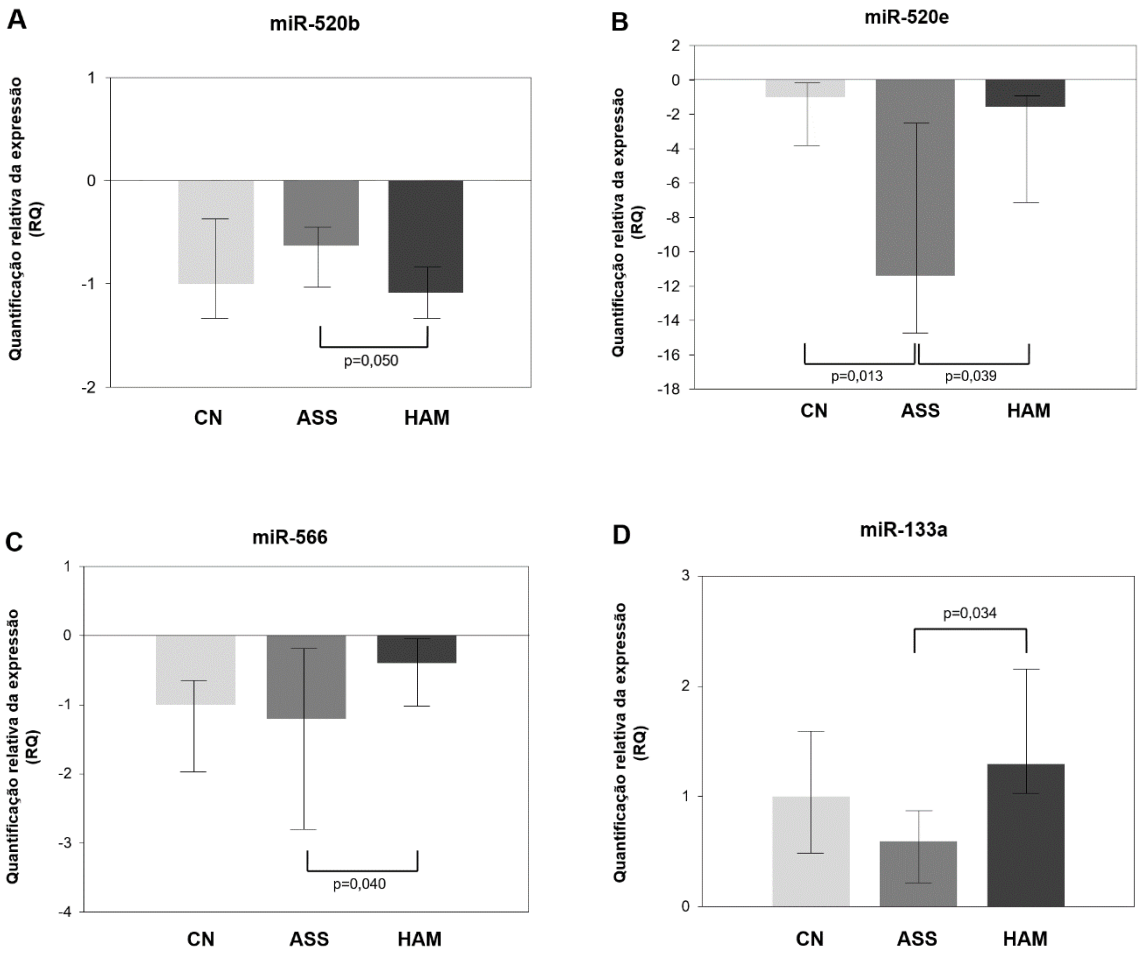


Figura 16. Comparação da expressão relativa dos miRNAs desregulados nos pacientes com HAM/TSP.



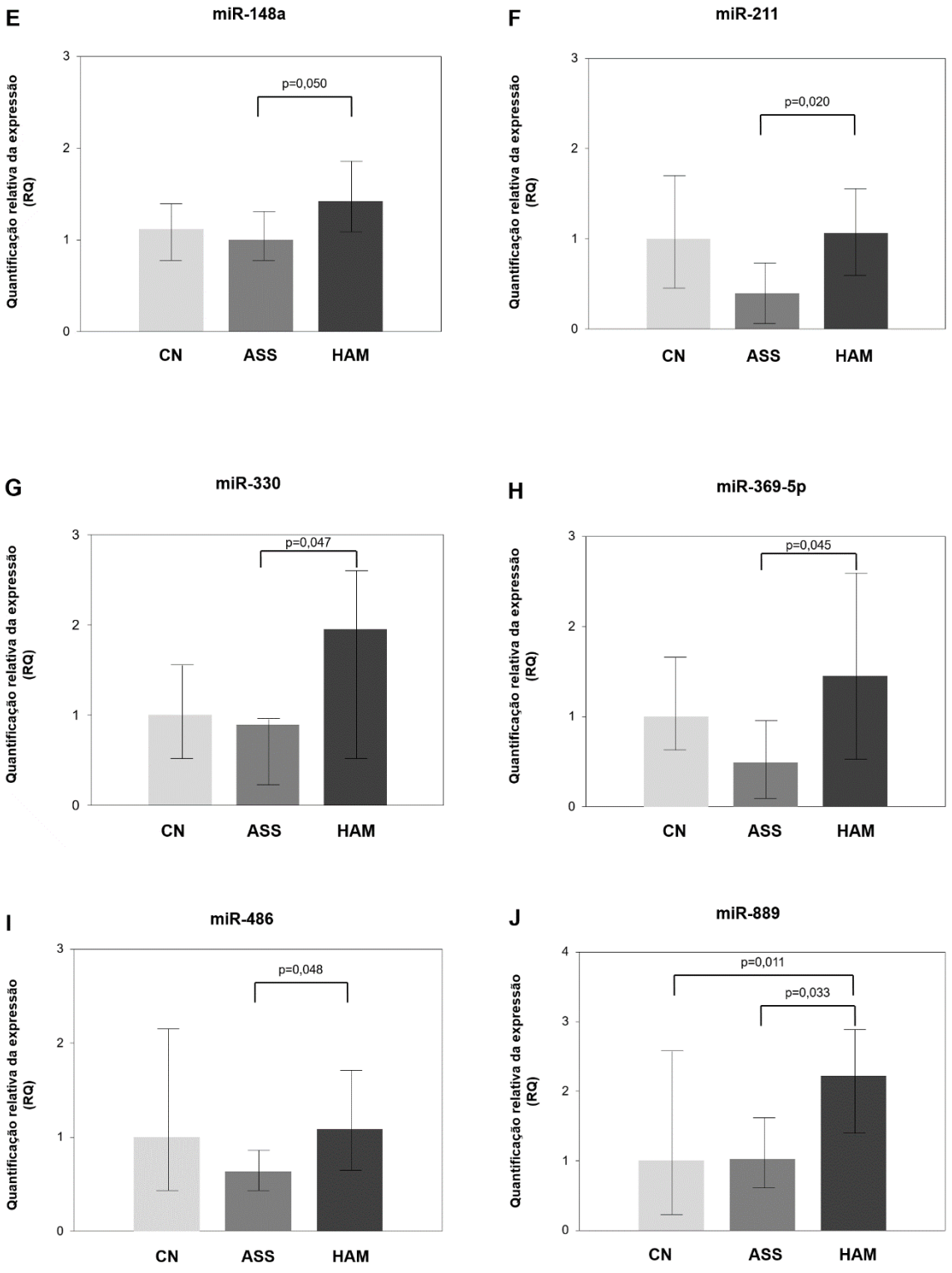


Figura 17. *RQ box plots* da expressão relativa dos miRNAs diferenciais detectados em células T CD4+ e T CD8+ de pacientes com HAM/TSP em comparação com o grupo de portadores assintomáticos. As diferenças

estatísticas foram calculadas, utilizando os programas estatísticos *Graphpad Prism* v. 7.0 e *ExpressionSuite* v. 1.0 (Thermo Fisher Scientific), uma ferramenta que utiliza o método comparativo de Ct (ΔΔCt) para quantificar a expressão relativa em meio a um grande número de miRNAs e de amostras.

O Diagrama de Venn apresenta o número de miRNAs diferencialmente expressos em cada grupo e quantos foram expressos simultaneamente entre os grupos (**Figura 18**). Observou-se que três miRNAs (hsa-miR-588, -598 e -627), cuja expressão foi significativamente diferente entre os grupos estudados, foram detectados simultaneamente nos grupos ASS e HAM, quando comparados ao grupo CN. Todos os três miRNAs apresentaram-se sub-expressos em ambos os grupos ASS e HAM (**Figura 19A**, **19B** e **19C**).

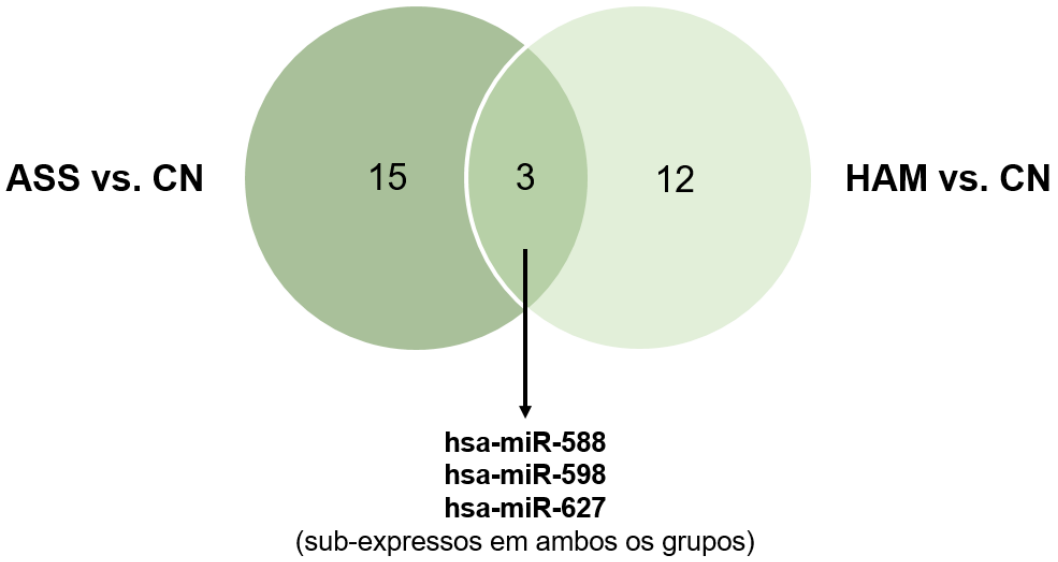


Figura 18. Diagrama de Venn dos microRNAs desregulados identificados nos grupos ASS e HAM. Representação gráfica do número de miRNAs expressos em cada grupo estudado e sua intersecção.

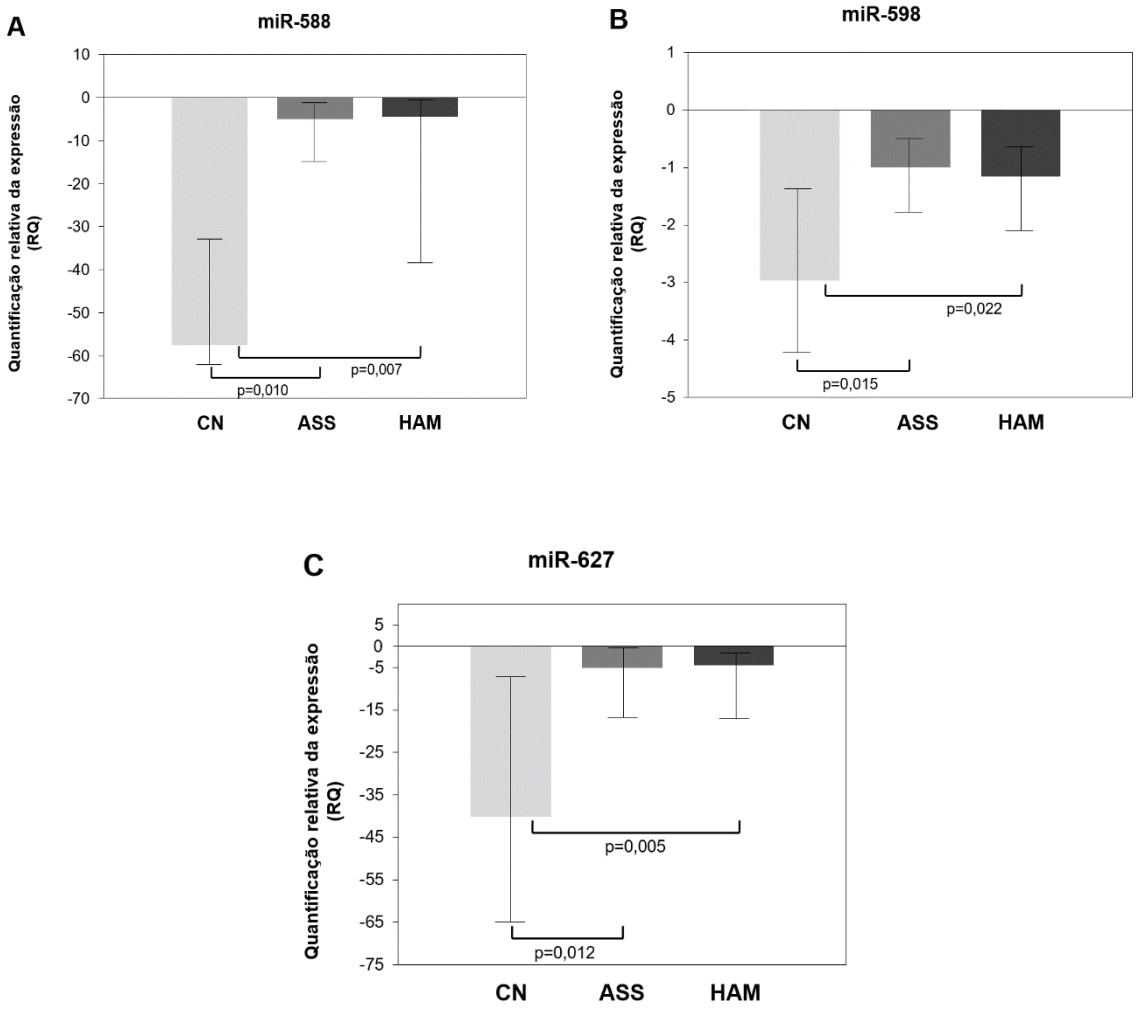


Figura 19. *RQ box plots* da expressão relativa dos três miRNAs diferenciais simultaneamente expressos em células T CD4+ e T CD8+ nos grupos HAM e ASS. As diferenças estatísticas foram calculadas, utilizando os programas programa estatístico *Graphpad Prism* v. 7.0 e *ExpressionSuite* v. 1.0 (Thermo Fisher Scientific), uma ferramenta que utiliza o método comparativo de Ct (ΔΔCt) para quantificar a expressão relativa em meio a um grande número de miRNAs e de amostras.

Para avaliar o agrupamento das amostras por similaridade da expressão de miRNAs foi utilizado o programa *ExpressionSuite* v. 1.0 (Thermo Fisher Scientific). Para tanto, foi construído um *heat map* de agrupamento hierárquico não supervisionado com base na correlação de *Pearson* (**Figura 20**). Não foi possível observar no dendrograma um padrão capaz de distinguir os grupos CN, ASS e HAM.

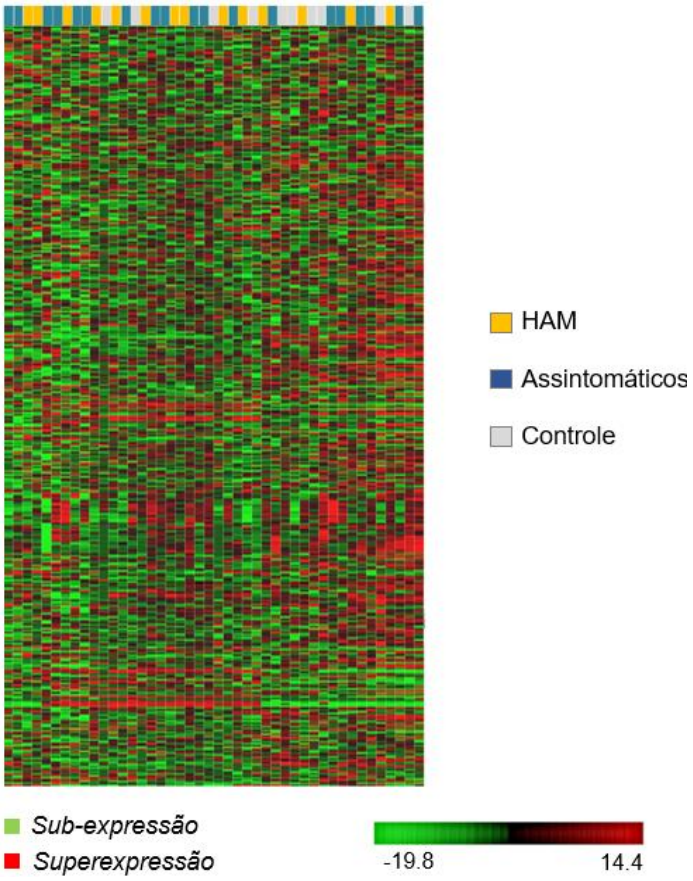


Figura 20. Agrupamento hierárquico não supervisionado do perfil de expressão de microRNAs nos grupos CN, ASS e HAM. Dendrograma obtido com base na correlação de *Pearson* e *Z score*. Cada linha representa um miRNA e cada coluna uma amostra. A escala de cor mostrada ilustra o nível de expressão relativa (ΔCt) dos miRNAs em todas as amostras, na qual a cor vermelha e a cor verde representam expressão acima e abaixo da média, respectivamente, após a normalização global.

4.5.3. Análises de bioinformática

4.5.3.1. Predição de RNAm alvos

Para examinar as interações entre miRNAs e moléculas-alvo preditas por ferramentas bioinformáticas foi utilizado o programa IPA, sendo considerado $p<0,05$ como nível de confiança de predição.

Primeiramente, foi feita uma análise de predição de alvos associados aos miRNAs diferencialmente expressos nos grupos estudados. As **Tabelas 6, 7 e 8** apresentam os resultados dessa predição, comparando-se os grupos HAM *vs.* ASS, ASS *vs.* CN e HAM *vs.* CN e considerando-se o número total de alvos relacionados, apenas alvos experimentalmente validados pelos bancos de dados *TarBase* e *miRecords* e altamente preditos como alvos (banco de dados miRbase). Quando comparados os miRNAs diferencialmente expressos nos grupos HAM e ASS, observou-se que oito miRNAs desregulados apresentaram um total de 4.425 RNAm alvos; considerando apenas os experimentalmente validados, cinco miRNAs desregulados identificaram 136 RNAm alvos, e considerando, finalmente, os experimentalmente validados e altamente preditos, os oito miRNAs desregulados detectaram 2.357 RNAm alvos. Dos miRNAs desregulados no grupo HAM (*vs.* ASS), os miRNAs, hsa-mir-133a, -211 e -520e foram os que apresentaram maior número de alvos.

Tabela 6. Número de RNAm identificados na análise *in silico* como alvos preditos associados aos miRNAs diferencialmente expressos no grupo HAM (*vs.* ASS).

microRNAs (HAM *vs.* ASS)	Número de RNAm alvos
A) Alvos totais	
hsa-mir-520e	1.239
hsa-mir-211	1.226
hsa-mir-133a	997
hsa-mir-330	653
hsa-mir-566	576
hsa-mir-486	501
hsa-mir-889	140
hsa-mir-369-5p	107
8 miRNAs	**4.425 alvos**
B) Alvos experimentalmente validados	
hsa-mir-520e	86
hsa-mir-133a	25
hsa-mir-211	20
hsa-mir-486	5
hsa-mir-330	1
5 miRNAs	**136 alvos**
C) Alvos experimentalmente validados e com predição altamente confiável	
hsa-mir-520e	918
hsa-mir-211	728
hsa-mir-133a	703
hsa-mir-486	223
hsa-mir-566	95
hsa-mir-330	47
hsa-mir-369-5p	18
hsa-mir-889	5
8 miRNAs	**2.357 alvos**

Legenda. Análise *in silico* realizada, utilizando o programa *IPA © Ingenuity Systems*, Inc. *MiRNA/mRNA target* (*expression pairing*).

Tabela 7. Número de RNAm identificados na análise *in silico* como alvos preditos associados aos miRNAs diferencialmente expressos no grupo ASS (*vs.* CN).

microRNAs (ASS *vs.* CN)	Número de RNAm alvos
A) Alvos totais	
hsa-mir-625	1.796
hsa-mir-302c	1.239
hsa-mir-211	1.226
hsa-mir-135a-5p	1.097
hsa-mir-320B	1.073
hsa-mir-381	1.070
hsa-mir-588	1.060
hsa-mir-516-3p	776
hsa-mir-139-5p	690
hsa-mir-425-5p	568
hsa-mir-1253	524
hsa-mir-589	513
hsa-mir-627-5p	441
hsa-mir-219a-1-3p	346
hsa-mir-598-3p	187
hsa-mir-126a-3p	111
16 miRNAs	**7.938 alvos**
B) Alvos experimentalmente validados	
hsa-mir-302c	86
hsa-mir-211-5p	20
hsa-mir-126a-3p	8
hsa-mir-135a-5p	8
hsa-mir-139-5p	6
hsa-mir-320B	4
hsa-mir-516-3p	2
hsa-mir-625-5p	1
8 miRNAs	**131 alvos**

Tabela 7. Continuação.

microRNAs (ASS *vs.* CN)	Número de RNAm alvos
C) Alvos experimentalmente validados e com predição altamente confiável	
hsa-mir-302c	918
hsa-mir-381-3p	887
hsa-mir-320B	801
hsa-mir-135a-5p	749
hsa-mir-211-5p	728
hsa-mir-625-5p	503
hsa-mir-139-5p	379
hsa-mir-425-5p	238
hsa-mir-588	215
hsa-mir-516-3p	110
hsa-mir-589-5p	81
hsa-mir-627-5p	41
hsa-mir-219a-1-3p	38
hsa-mir-126a-3p	37
hsa-mir-1253	25
hsa-mir-598-3p	22
16 miRNAs	**4.155 alvos**

Legenda. Análise *in silico* realizada, utilizando o programa *IPA © Ingenuity Systems*, Inc. *MiRNA/mRNA target* (*expression pairing*).

Tabela 8. Número de RNAm identificados na análise *in silico* como alvos preditos associados aos miRNAs diferencialmente expressos no grupo HAM (*vs.* CN).

microRNAs (HAM *vs.* CN)	Número de RNAm alvos
A) Alvos totais	
hsa-mir-449b	1.476
hsa-mir-1225-3p	1.231
hsa-mir-588	1.060
hsa-mir-708	874
hsa-mir-938	520
hsa-mir-412	490
hsa-mir-573	481
hsa-mir-26a-2	464
hsa-mir-627-5p	441
hsa-mir-548-5p	281
hsa-mir-618	281
hsa-mir-518b	209
hsa-mir-598	187
hsa-mir-576-5p	146
14 miRNAs	**6.180 alvos**
B) Alvos experimentalmente validados	
hsa-mir-449b	26
hsa-mir-548-5p	2
2 miRNAs	**28 alvos**

Tabela 8. Continuação.

microRNAs (HAM *vs.* CN)	Número de RNAm alvos
C) Alvos experimentalmente validados e com predição altamente confiável	
hsa-mir-449b	808
hsa-mir-1225-3p	352
hsa-mir-708	300
hsa-mir-588	215
hsa-mir-938	77
hsa-mir-412	67
hsa-mir-573	51
hsa-mir-627-5p	41
hsa-mir-518b	34
hsa-mir-26a-2	27
hsa-mir-598	22
hsa-mir-548-5p	10
hsa-mir-618	9
hsa-mir-576-5p	4
14 miRNAs	**1.868 alvos**

Legenda. Análise *in silico* realizada, utilizando o programa *IPA © Ingenuity Systems*, Inc. *MiRNA/mRNA target* (*expression pairing*).

Tomando como base a expressão diferencial de miRNAs entre os grupos ASS e HAM e a identificação de seus RNAm alvos, buscou-se identificar as funções biológicas e vias canônicas às quais se relacionam. Para confirmação das funções biológicas dos genes preditos, análises funcionais foram realizadas no IPA. Foram geradas 25 redes gênicas, com valores de escores variando de 31 a 38. A **Tabela 9** mostra doenças e funções biológicas e moleculares reconhecidamente relacionadas às respectivas moléculas de cada rede. A primeira rede da lista com escore mais alto (escore = 38) associou 35 moléculas elegíveis a partir da base de dados do IPA. As funções significativamente relacionadas a essas moléculas foram desenvolvimento e função do Sistema Nervoso, regulação pós-transcricional e ciclo celular.

Tabela 9. Redes gênicas com os 10 escores mais altos obtidas do IPA, geradas com base na expressão de miRNAs desregulados no grupo HAM quando comparado ao grupo ASS.

Rede	Moléculas da rede	Escore	Moléculas em foco	Redes gênicas potencialmente afetadas
1	AHNAK, ARRB1, BHLHE22, BTBD1, C9orf78, CTBP2, DGKE, DGKG, ERP44, EZR, FBXL17, GRIN3A, KLHL12, KXD1, LMO3, NEFL, NHLH2, PHLPP2, PRDM8, STX11, UBXN1, UBXN7, USP6, USP12, USP24, USP32, USP46, USP47, VAT1, VSX1, WDR20, WDR26, ZBTB18, ZBTB43, ZNF217	38	35	• Desenvolvimento e função do Sistema Nervoso • Regulação pós-transcricional • Ciclo celular
2	ANKRD46, AP1AR, ARID1A, C14orf2, C16orf72, C5orf15, Cdc42, CNN2, ELAVL1, ELMSAN1, GFAP, GPCPD1, IFNLR1, KLF10, LIF, LRRC58, MFSD13A, MLLT6, NFIA, NFIB, NUFIP2, OLIG3, PRELID3B, SLC50A1, SMIM14, TCF12, TENM4, TFAP4, TRERF1, UNK, XXYLT1, YIPF6, ZDHHC8, ZHX3, ZNF77	38	35	• Desenvolvimento e função do Sistema Nervoso • Organização celular • Morfologia celular
3	A1CF, ACTR8, APBB2, CCNJ, CDK2, CDK19, CMTR2, DCAF10, EEF1E1, FBXW7, GOLGA3, INO80D, JRKL, LMTK2, MED8, MED28, MED12L, MED13L, OXR1, PAPD5, RAPGEF5, RRP15, SGTB, SH3PXD2B, SNX8, SORT1, SPRYD3, SYNCRIP, TAL1, TOX, UTP15, UVSSA, YARS, ZBTB21, ZC3H13	38	35	• Desenvolvimento celular • Desenvolvimento e função do Sistema Hematológico • Hematopoiese

Rede	Moléculas da rede	Escore	Moléculas em foco	Redes gênicas potencialmente afetadas
4	ABCA1, AK2, APC, CAPRIN1, CD209, CHD9, CYLD, ELK4, EXPH5, FAM217B, KMT2D, MAP3K1, MBD2, MCL1, MKL1, MKL2, NCKAP5, NUP58, ODF2L, OTUD7B, PAK2, PKHD1L1, PPARA, RBBP5, REEP3, RELL1, RNF216, SLC16A12, SP3, SRF, TET2, TRAF3, TRIQK, XYLT1, ZIC3	38	35	• Crescimento e proliferação celular • Desenvolvimento celular • Doença hematológica
5	AGO1, CAMSAP1, CCDC85C, CCDC88A, CENPJ, CEP350, CNOT1, DCP1A, DLG5, ETF1, FBXL4, G protein, GPBP1L1, GSPT1, HAUS2, HAUS6, HAUS8, NIN, NMT1, PAN3, PLCXD1, PPP1R37, RAVER1, SASS6, SCNM1, SSX2IP, TNRC6A, TNRC6B, TNRC6C, TTC28, UPF3A, WDCP, XPO1, XRN1, ZSCAN12	35	34	• Ciclo celular • Função celular • Organização celular
6	BCL11A, CASC3, CDC40, DDX18, DDX31, ELAVL2, GCNT2, LARP4, LIN28B, LUC7L2, MKRN1, NR2E1, P3H2, PLSCR1, PRR11, PRRC2C, RBMX, RERE, RSBN1, RSBN1L, Shc, SPTY2D1, SRPK1, SRSF3, SRSF12, TARDBP, TRA2B, TRAPPC2, TRAPPC6B, WTAP, ZBTB4, ZBTB11, ZBTB38, ZCCHC10, ZNF800	35	34	• Regulação pós-transcricional • Doença hematológica
7	ATXN1, BCL11B, BCL7A, BLCAP, CARM1, CDIP1, DAZAP2, FAM46A, FAM46B, FAM46C, FNDC3A, GLTSCR1L, GRM5, INTS6, KCTD15, NABP1, NFX1, NR2C1, NR2C2, NR2F2, PEG10, QKI, RARB, SEPT2, SEPT11, Septin, SIAH1, SMARCD1, SS18L1, ST6GALNAC6, TBC1D22B, TCF7, TFAP2A, UNKL, ZFPM2	35	34	• Doença imunológica • Doença do sitema hepático

Rede	Moléculas da rede	Escore	Moléculas em foco	Redes gênicas potencialmente afetadas
8	ANKRD50, ARL13B, ARL5B, CAMK2D, CDCA8, CDH2, CDK5R1, CNKSR2, CNP, CUX2, DCX, DLGAP2, DMXL1, DPYSL3, DPYSL5, FOXN3, GDA, GRIN2B, KCNA1, LRRC7, MAPKAP1, MIB1, MYT1L, NTRK2, PHYHIPL, PP1 protein complex group, RHO, RYR2, SBNO1, SCN5A, SGK1, SH3PXD2A, SNTB2, TUBB1, tubulin (complex)	33	33	• Doença neurológica • Transtornos psicológicos • Morfologia celular
9	ADAMTS18, AGPS, BCL2L1, BCL9L, BTG1, Caspase 3/7, CD200, CDC2-CDK4-BTG1-CNOT7, CHD2, CSPG5, DBNL, ELAVL3, FBXW2, FBXW8, HABP4, KIAA1429, KLF13, LRRN4CL, MDM4, NADK, NPAS3, PHF6, RBM23, RBM25, RBM15B, RBMXL1, RSRC2, SIPA1L3, SRPK2, SRSF1, TLE4, TMEM14A, ZC3H14, ZC3H11A, ZMYND11	33	33	• Regulação pós-transcricional • Transtorno de desenvolvimento • Distúrbio hereditário
10	ADORA2A, ANK2, AP3M1, BICD2, C17orf96, CCDC6, CNTNAP2, CPD, EPB41, FHL1, ITPR, KIAA1147, LSAMP, MICALL1, NEK6, NEK7, NEK9, OTOF, PALM2, PP2A, PPP2CA, PPP2CB, RAB10, RAB6A, SETBP1, SLC6A4, SMPD3, Spectrin, SPTBN1, STRIP2, TAGLN2, TGOLN2, TMEM33, XPO5, ZRANB1	31	32	• Desenvolvimento e função do Sistema Nervoso • Ciclo celular • Organização celular

Legenda. Escores IPA >2 indicam forte interferência da via analisada. Quanto maior os valores de escores maior a associação entre os genes importados e as moléculas do banco de dados IPA.

4.5.3.2. Vias canônicas significativamente associadas aos miRNAs desregulados e seus alvos preditos no grupo HAM, quando comparados aos ASS

O programa IPA também foi utilizado para identificar vias canônicas geradas com base nos miRNAs desregulados no grupo HAM (*vs.* ASS) e no banco de dados de redes gráficas de genes do IPA, denominado *Ingenuity Knowledge Base* (IKB). A **Figura 21** mostra o percentual de redes gênicas identificadas, potencialmente afetadas pelos miRNAs desregulados no grupo HAM. Observou-se que as funções biológicas relacionadas a neoplasias (28%), desenvolvimento e função do Sistema Nervoso (18%), ciclo e proliferação celular (14%), indução/modulação da resposta imunológica (12%), regulação gênica (12%), desenvolvimento embriogênico (7%) e regulação do metabolismo (6%) foram as mais frequentemente reveladas.

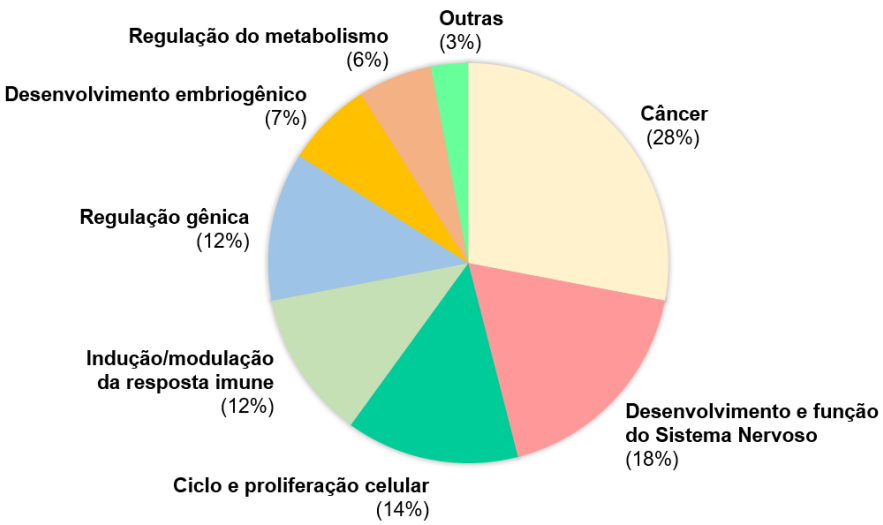


Figura 21. Distribuição das redes gênicas identificadas pelo IPA como potencialmente afetadas pelos miRNAs desregulados no grupo HAM, quando comparado ao grupo ASS.

A **Figura 22** apresenta as vias canônicas e os percentuais de moléculas dessas respectivas vias que se encontram relacionadas aos miRNAs desregulados detectados no presente estudo, a saber, *ERK5 Signaling* (33%)*, Protein Kinase A Signaling* (20%), *CREB Signaling in Neurons* (24%), *TGF-β Signaling* (23%), *NF-κb Signaling* (25%), NGF *Signaling* (25%) *Ephrin Receptor Signaling* (24%) e *Neuropathic Pain Signaling in Neurons* (20%), que passam a ser detalhadas a seguir.

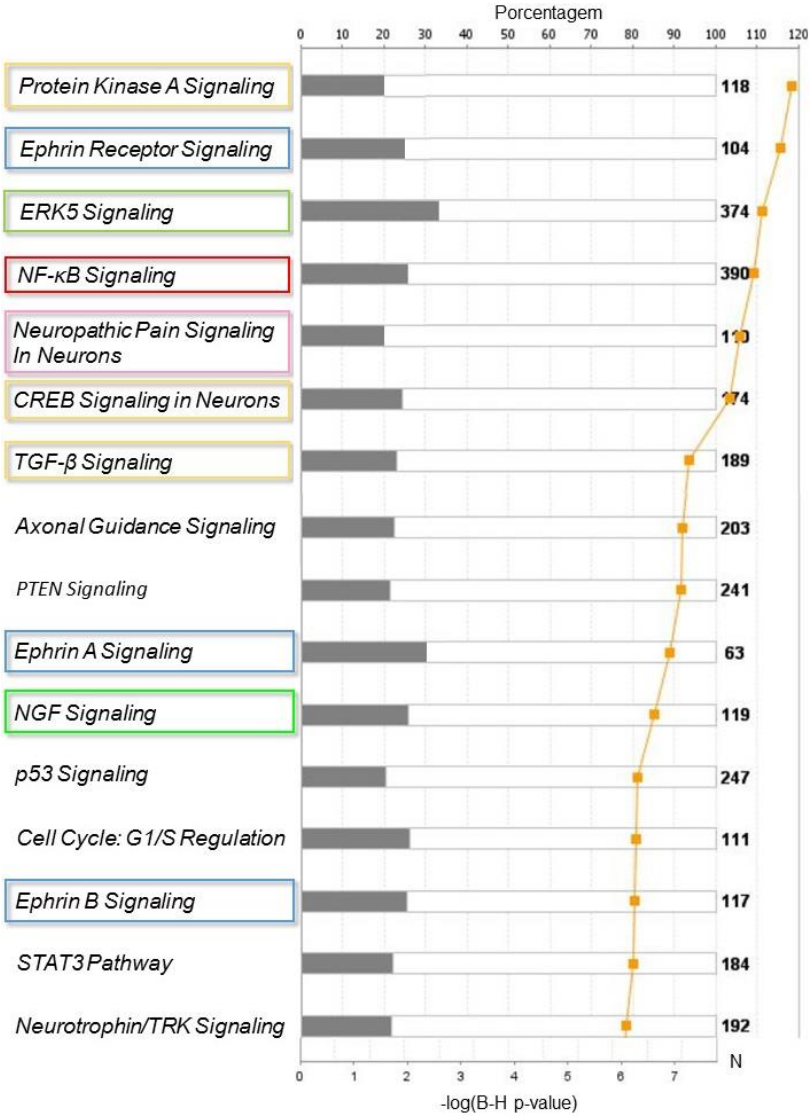


Figura 22. Percentual de moléculas nodais e as suas respectivas vias que estão relacionadas aos miRNAs desregulados no grupo HAM, quando

comparado ao grupo ASS. N: número total de moléculas que integram a via. Os valores de *p* foram obtidos pelo teste de significância múltipla de *Benjamini-Hochberg*, que corrige os valores de *p*, quando vários testes estatísticos dependentes ou independentes são empregados, simultaneamente, em um único conjunto de dados. As vias destacadas com a mesma cor do contorno se interligam, por isso serão apresentadas a seguir, mescladas. As vias foram construídas com base nas informações da base de dados atualizadas em julho de 2016.

4.5.3.3. Análise detalhada das redes gênicas afetadas por microRNAs desregulados no grupo HAM em comparação com o grupo ASS

Nas análises realizadas no IPA, foram observadas redes gênicas potencialmente alteradas, envolvendo frequentemente vias de processos de proliferação e ciclo celular, de função do sistema nervoso e de indução/modulação de resposta imunológica (**Tabela 9**). Analisando os miRNAs significativamente desregulados no grupo HAM (*vs.* ASS), foram construídas as redes gênicas biologicamente mais representativas e relacionadas à patogênese da HAM/TSP (**Figuras 23, 24, 25, 26, 27** e **28**). O IPA também foi utilizado para a análise de predição do estado de ativação das vias e as moléculas que as compõem, baseando-se na expressão dos miRNAs. Em verde foram representados os miRNAs sub-expressos (*fold-change* negativo) e em vermelho, os super-expressos (*fold-change* positivo).

Na rede gênica *ERK5* (*Extracellular-signal-regulated kinase 5*) foi observado que dois miRNAs atuam em nível extracelular e intracelular (hsa-miR-330, superexpresso e -miR 520e, sub-expresso), três em nível de membrana celular e cinco no ambiente intracelular. O hsa-miR-330 (superexpresso) inibe a ação extracelular da molécula EGF (*Epidermal growth factor*) sobre o receptor EGFR (*Epidermal growth factor receptor*), que é regulada diretamente pelo hsa-miR-133a. Já o hsa-miR-520e (sub-expresso), ativa a molécula LIF (*Leukemia inhibitory factor*) no ambiente extracelular, que aumenta a expressão de IL6ST (*Interleukin 6 signal transducer*), que uma vez expressa, ativa o gene PTPN11 (*Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*), relacionado a processos para o desenvolvimento de neurite. Em contraste, o hsa-miR-211 (superexpresso), inibe as moléculas IL6ST e a PTPN11 e também, o gene WNK1 (*WNK lysine deficient protein kinase 1*), que pouco expresso, inibe a ação de MEKK2/3 na via *ERK5*, fazendo com que MAP2K5 (*Mitogen-activated protein kinase 5*) seja ativada, e por conseguinte, ative a principal molécula da via, a ERK5, responsável por ativar diversos fatores de transcrição em nível celular, culminando na regulação direta da expressão gênica. O hsa-miR-133a, além de regular a proteína de membrana EGFR, inibe a ação da molécula SGK1, diretamente envolvida com a regulação da expressão gênica. O hsa-miR-330 (superexpresso), diminui a expressão de MAP2K5 (*Mitogen-activated protein kinase 5*) na via *ERK5* e age diretamente em nível nuclear, regulando o fator de transcição ELK4 (*ETS-domain protein SRF accessory protein 1*). O hsa-miR-520e (sub-expresso), além de LIF e EGFR (anteriormente relatados), ativa as moléculas FOXO3 (*Forkhead box protein O3*) e AKT1 (*AKT serine/threonine kinase 1*). Por fim, na via *ERK5*, o hsa-miR-566 (sub-expresso), atua em nível citoplasmático, ativando a molécula BAD (*Bcl-2-associated death promoter*), aumentando a sobrevivência celular, e em nível nuclear, ativando diretamente o fator de transcrição FOSL1 (*FOS like 1, AP-1 transcription factor subunit*), culminando na expressão gênica.

- **Via canônica da *ERK5***

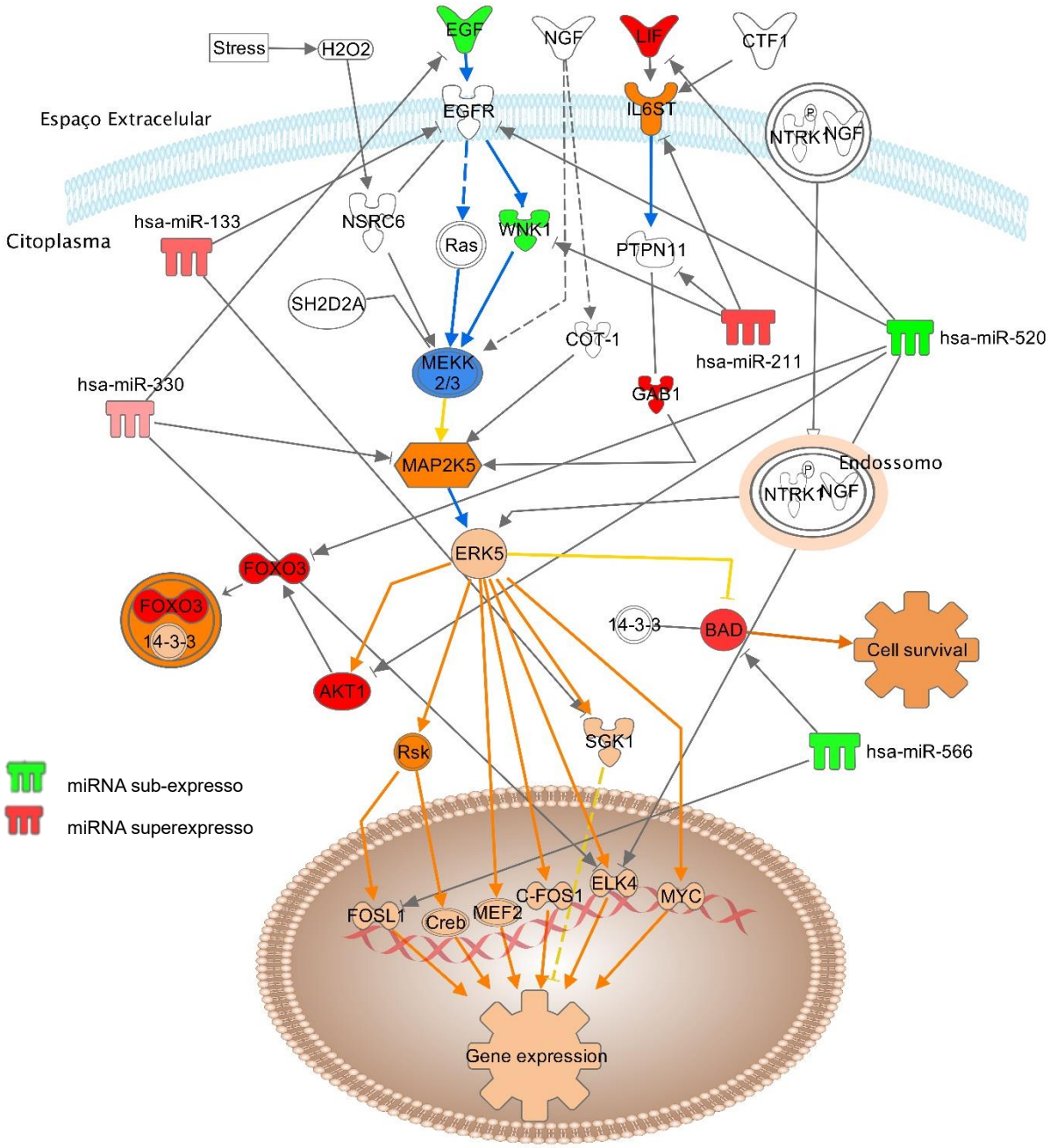


Figura 23. Representação gráfica da via canônica da *ERK5*, incluindo as moléculas nodais relacionadas aos microRNAs diferencialmente expressos detectados no grupo HAM no presente estudo. A via ERK5 relaciona-se com mecanismos de sobrevivência celular, regulando a proliferação e diferenciação celular.

A rede gênica *Protein Kinase A Signaling*, na qual a proteína quinase A (PKA) apresenta papel central, mostrou que essa molécula, embora não seja alvo direto de miRNAs, apresenta cinco (hsa-miR-133a, -211, -889, -330 e -486) dos 10 miRNAs super-expressos no grupo HAM (*vs.* grupo ASS), relacionados a sua via. Uma vez que, as redes dos fatores de transcrição CREB (*cAMP-responsive element binding protein*), TGF-β (*transforming growth factor beta*) e NF-κb (*nuclear factor* NF-κb) também foram apontadas como vias canônicas associadas ao grupo HAM (**Figura 24**), e sabidamente, integram a via PKA, essas três vias canônicas estão apresentadas na rede da PKA.

Na via TGF-β foi demonstrada a ação dos miRNAs hsa-miR-133a, -211 e -889, que superexpressos, inibem a ação dos genes TGFBR1 e TGFBR2 (*TGF-βeta receptor type-1 and type-2 precursors*) e a molécula SMAD4 (*SMAD Family Member 4*), e por conseguinte, inibem o complexo AKAP (PKAr + *Pka catalytic subunit*). Em contrapartida, foi identificada uma predição inconsistente, uma vez que o hsa-miR-566, sub-expresso, aumenta a expressão das TGFBRs, ativando a via TGF-β, e por consequência, ativando a via PKA em nível nuclear, ao ativar a molécula *Histone* h3.

Na via CREB observou-se que os hsa-miR-211 e -302a, superexpressos, inibem a ação da molécula CREB A, que subexpressa, inibe EBI3 (*Interleukin-27 subunit beta precursor*), e consequentemente, a replicação viral.

Na via NF-κb foi mostrado que o hsa-miR-330, superexpresso, inibe a GNA13 (*G protein subunit alpha 13*), que, por sua vez, inibe a molécula RHOA (*RHOA ras homolog family member A*), molécula alvo do miR-133a. Esta, quando desativada, inibe a CHUK (*conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase*) e consequentemente ativa a via NF-κb, pois se sabe que CHUK ativada, forma o

complexo IKB/NFkB (*IkB kinase/nuclear transcription factor kappa B*) que inativa a via NF-κb. Além destes, o hsa-miR-889, superexpresso, inibe a ação de MAP3K1 (*MAP3K1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*), que desativada, diminui a expressão de CHUK, e, consequentemente, degrada o complexo IKB/NFkB, liberando a via NF-κb.

Ainda na via PKA, observou-se que o hsa-miR-211 e o -486, superexpressos, ativam a molécula DCC (*netrin 1 receptor*), que inibe a ação da ADCY (*adenylate cyclases*), impedindo que o complexo ATP/cAMP (*adenosine triphosphate/3'5'-cyclic adenosine monophosphate*) seja formado, e por conseguinte, ative a PKAr. O hsa-miR-302c superexpresso, além de atuar nas vias TGF-β, CREB e NF-κb, inibe a molécula RHO (*Rho Factor*), que inibe a dessensibilização. O hsa-miR-566, sub-expresso, além de ativar a via TGF-β, aumentando a expressão das TGFBRs, ativa a molécula DCC, receptor da NTN1 (*netrin 1*), aumentando a expressão de ADCY, que induz a formação do complexo ATP/cAMP, resultando na formação da AKAP e desencadeando a via PKA em nível nuclear, ao ativar a molécula *Histone* h3. O hsa-miR-566, sub-expresso, ativa a molécula BAD (*Bcl-2-associated death promoter*), que atua na sobrevivência celular, além da molécula PPPR1B (*protein phosphatase 1, regulatory subunit 1B*) do complexo grupo de proteínas PP1, que expressa, atua em nível nuclear, ativando Creb e ATF-1 (*activating transcription factor 1*). Por outro lado, o hsa-miR-330 (superexpresso) atua inversamente sobre a PPPR1B, uma vez que, subexpressa, inibe Creb e ATF-1. O hsa-miR-330 (superexpresso), além de atuar na via NF-κb e na molécula do complexo de proteínas PP1, inibe diretamente o fator de transcrição CREM (*cAMP-responsive element modulator*) e a molécula CTNNB1 (*Catenin beta-1*).

- **Via canônica da *Protein Kinase A***
(*PKA + TGF-β + CREB + NF-κb Signaling*)

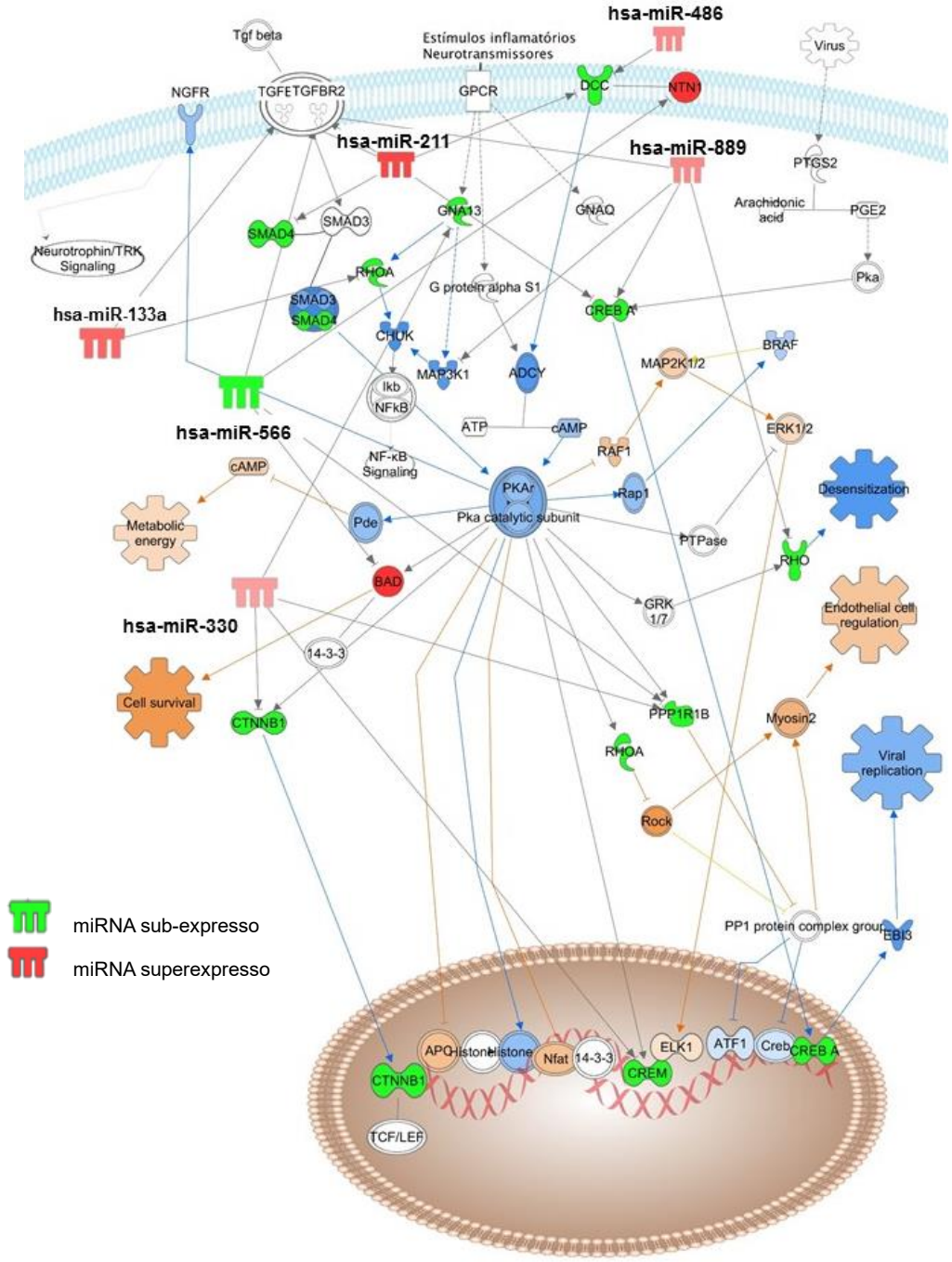


Figura 24. Representação gráfica da via canônica da *Protein Kinase A*, incluindo as moléculas nodais relacionadas aos microRNAs diferencialmente expressos detectados no grupo HAM no presente estudo. A PKA altera as atividades de proteínas-alvo, fosforilando grupos específicos de serina e treonina.

A via do fator de transcrição nuclear kappa B (*NF-κb*) demonstrou ser potencialmente regulada pelos importante papel dos miRNAs em nível extra e intracelular. O hsa-miR-330 (superexpresso), inibe a molécula EGF (*Epidermal growth factor*), que inibe o *Growth factor recetor*, que, por sua vez, pouco expresso, ativa a ação de RAS (*Ras oncogene family*), de PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) e AKT (*Protein kinase B*) sobre o complexo CHUK (*conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase*). Em nível citoplasmático, o hsa-miR-330 diminui a expressão do gene BTRC (*beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*), que interage diretamente com o complexo Ikb/NFKB1/RelA, que atua em nível nuclear. No citoplasma, o hsa-miR-211 (superexpresso), inibe a molécula TNFAIP3 (*TNF alpha induced protein 3*), que pouco expressa, ativa o gene TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*). O hsa-miR-889 (superexpresso), diminui a expressão de MAP3K7IP1-beta (*Mitogen-activated protein kinase 7-interacting protein 1*), impedindo a ação de MAP3K7 (*Mitogen-activated protein kinase 7*) sobre CHUK. Em contrapartida, o hsa-miR-566 (sub-expresso) ativa MAP3K7IP1-beta e NAF1A (*BCL-2-associated autophagy regulator*), que interagem diretamente com CHUK, aumentando a sua expressão. O hsa-miR-369 (superexpresso), diminui a expressão de AZI2 (*AZI2 5-azacytidine induced 2*), que inibe TK1 (*Thymidine kinase 1*), impedindo que esta, ative o complexo RelA/NK-kB (*p65 heterodimere NK-kB*) em nível celular. O hsa-miR-486 (superexpresso), inibe a ação do IRAK3 (*Interleukin 1 receptor associated kinase 3*), relacionado à ação do gene TRAF6 e atua em nível nuclear, inibindo a molécula GSK3B (*Glycogen synthase kinase 3 beta*), que, pouco expressa, ativa o complexo RelA/NK-kB, desencadeando processos inflamatórios, de resposta imune, de sobrevivência e proliferação celular (**Figura 25)**.

- **Via canônica da NF-κb**

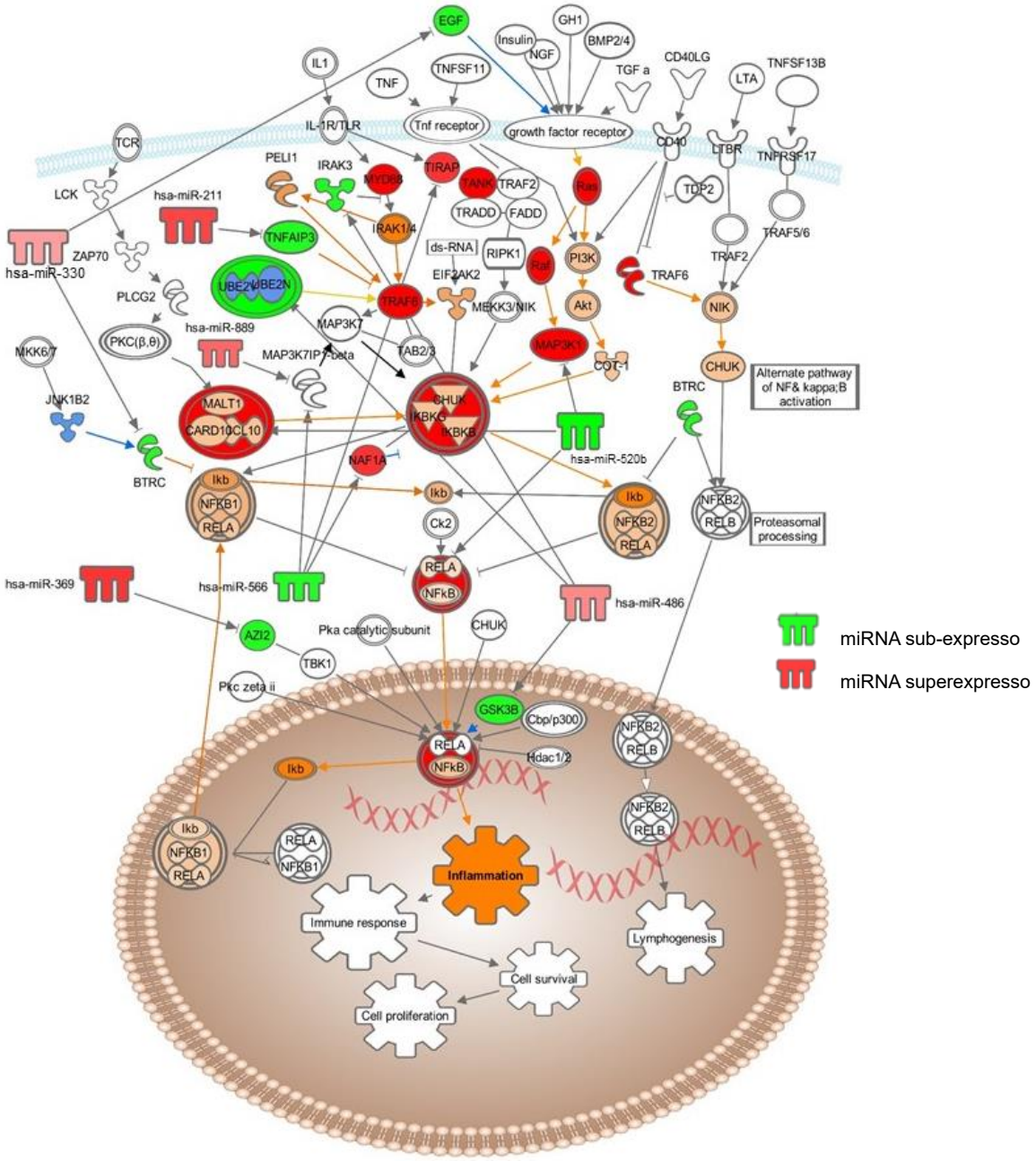


Figura 25. Representação gráfica da via canônica da NF-κb, incluindo as moléculas nodais relacionadas aos microRNAs diferencialmente expressos detectados no grupo HAM no presente estudo. Via relacionada a processos inflamatórios, de resposta imune, de sobrevivência e proliferação celular.

Na via NGF (*Nerve Growth Factor*) foi demonstrada a ação dos miRNAs hsa-miR-133a, -330 e -889, que superexpressos, inibem a ação da molécula CRK (*Adapter molecule crk*), e por conseguinte, não ativa a via CREB. Em contrapartida, o hsa-miR-211 (superexpresso) atua na inibição da molécula PTPN11 (*Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*), que pouco expressa, desencandeia processos para o desenvolvimento de neurite. Além disso, o hsa-miR-211 também ativa o gene CDC42 (*Cell division cycle 42*), que inibe a polimerização da actina. Em contraste, o hsa-miR-486 atua na molécula TRIO (*Trio Rho guanine nucleotide exchange factor*), que ativa RHOG (*ras homolog family member G*), aumentando a expressão de RAC1 (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 precursor*), que, por sua vez, ativa a polimerização da actina, e desencadeia processos para o desenvolvimento de neurite (**Figura 26**).

- **Via canônica da NGF**

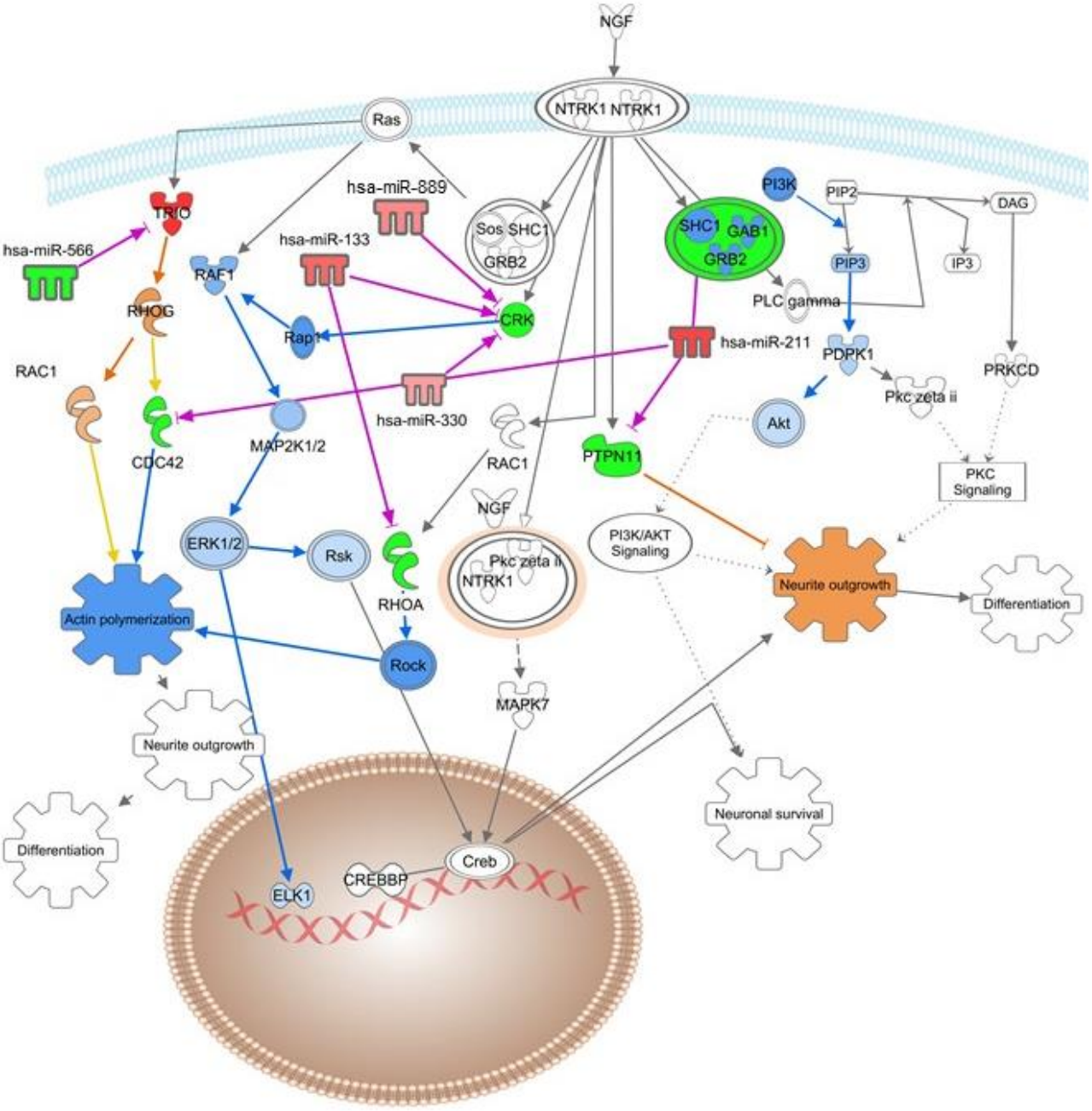


Figura 26. Representação gráfica da via canônica da NGF, incluindo as moléculas nodais relacionadas aos microRNAs diferencialmente expressos detectados no grupo HAM no presente estudo. A via regula o crescimento, manutenção e sobrevivência de neurônios.

A via *Ephrin Receptor Signaling* foi construída pelo IPA, demonstrando o papel dos miRNAs desregulados encontrados no presente estudo no contato célula-célula. No citoplasma da célula A (**Figura 27**) foi mostrada a ação do hsa-miR-133a (superexpresso), inibindo a ação da molécula RGS3 (*RGS3 regulator of G-protein signaling 3*), que participa da via da GTP (*cyclohydrolase I*), relacionada a processos de quimioatração e atração celular. Além disso, o hsa-miR-133a age no espaço extraceular, diminuindo a expressão do gene FGF1 (*FGF1 fibroblast growth factor 1*), que, em contrapartida, também é alvo do hsa-miR-566 (sub-expresso), que aumenta a sua expressão no ambiente extracelular. Quando ativada, FGF1 ativa o complexo RTK/RTK (*Receptor tyrosine kinase*) e por conseguinte, o complexo ENFB/ENFA (*EPH receptor B1* e *A1*) na membrana plasmática da célula A, que interagem com o complexo ENFB/ENFA na membrana plasmática da célula B, que, uma vez ativado, aumenta a expressão de INTERSECTIN-L (*Endocytic protein intersectin-l*) e de CDC42 (*CDC42 cell division cycle 42*), culminando na reorganização do citoesqueleto no citoplasma da célula B. Além do hsa-miR-566 (sub-expresso), mais dois hsa-miRNAS superexpressos (hsa-miR-211 e -330) apresentaram moléculas-alvo tanto no ambiente extracelular quanto intracelular. O hsa-miR-566 (sub-expresso), além de aumentar a expressão de FGF1 no ambiente extracelular, também age no citoplasma da célula B, aumentando a expressão de STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), que regula a proliferação celular. O hsa-miR-211 (superexpresso) detectado no citoplasma da célula B, age diretamente na CXCR4 (*CXCR4 C-X-C motif chemokine receptor 4*) da membrana plasmática da célula A, diminuindo a sua expressão e no ambiente extracelular, inibe a molécula ANG1 1.5 KB (*Angiopoietin 1 1.5-kb*

isoform), e por conseguinte, inibe o complexo RTK/RTK, localizado na membrana plasmática da célula B, relacionado a processos celulares como proliferação celular e orientação dos axônios. E, por fim, o miR-330 (superexpresso), além de agir no ambiente extracelular, inibindo a molécula EGF (*Epidermal growth factor*) e por conseguinte, inibindo o complexo RTK/RTK e inibindo a molécula ADAM 10 (*ADAM metallopeptidase domain 10*), relacionada à migração celular, também atua no citoplasma da célula B, diminuindo a expressão de RASA1 (*RAS p21 protein activator 1*), relacionada a processos celulares como proliferação celular e orientação dos axônios. No citoplasma da célula B, o hsa-miR-520e (sub-expresso) ativa o gene PTK2 (*PTK2 protein tyrosine kinase 2*), envolvido em processos de migração celular. E desempenhado papel central nessa via, o hsa-miR-211, além de atuar em nível extracelular, regulando as moléculas CXCR4 da célula A e a ANG1 1.5 KB do ambiente extracelular, regula quatro moléculas citoplasmáticas: 1) inibe PTPN11 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*), que interage com PTK2, que regula processos de migração celular; 2) inibe JAK2 (*Janus kinase 2*), que diminui a expressão de STAT 3, envolvida na proliferação celular; 3) inibe o gene CDC42, relacionado à reorganização do citoesqueleto e por fim, 4) inibe SHC1 (*SHC1 SHC adaptor protein 1*), envolvido com processos celulares de proliferação celular e orientação dos axônios.

- **Via canônica do *Ephrin Receptor* (*Ephrin A* e *Ephrin B Signaling*)**

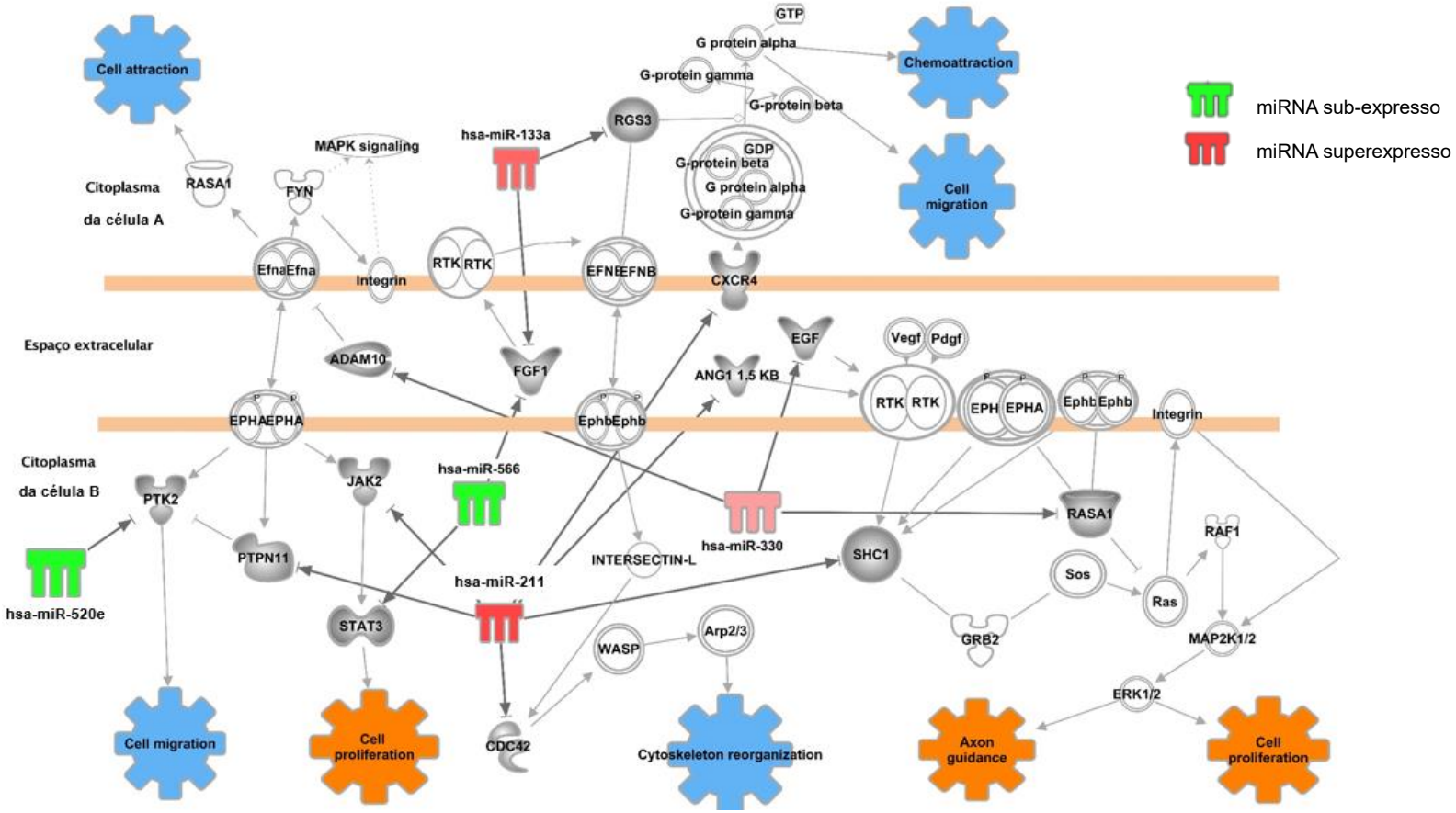


Figura 27. Representação gráfica da via canônica da *Ephrin Receptor*, incluindo as moléculas nodais relacionadas aos microRNAs diferencialmente expressos detectados no grupo HAM no presente estudo. A via Eph/ephrin tem sido implicada na regulação de processos embriogênicos crítcos, incluindo o *Axon guidance*, migração e proliferação celular e reorganização do citoesqueleto.

E por fim, a via *Neuropathic Pain Signaling In Neurons* foi construída pelo IPA, demonstrando o papel dos miRNAs desregulados encontrados no presente estudo no contato neurônio-neurônio. O hsa-miR-330 (superexpresso), localizado no neurônio pré-sináptico (ou seja, o que transmite sinal), diminui a expressão da molécula TAC 1 (*Tachykinin precursor 1*), que no ambiente extracelular, interage com o receptor TACR1 (*Tachykinin precursor receptor 1*), situado na membrana plasmática do neurônio pós-sináptico. No citoplasma do neurônio pós-sináptico, os hsa-miR-369 e -211 (superexpressos) inibem a ação NTRK2 (*Neurotrophic receptor tyrosine kinase 2*), que diminuem a expressão do gene PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*). Ainda, observou-se que o hsa-miR-211 (superexpresso) e o hsa-miR-520e (sub-expresso) regulam inversamente, o fator de transcrição CREB A (*cAMP-responsive element binding protein A*) em nível nuclear (**Figura 28**).

- **Via canônica da *Neuropathic Pain Signaling In Neurons***

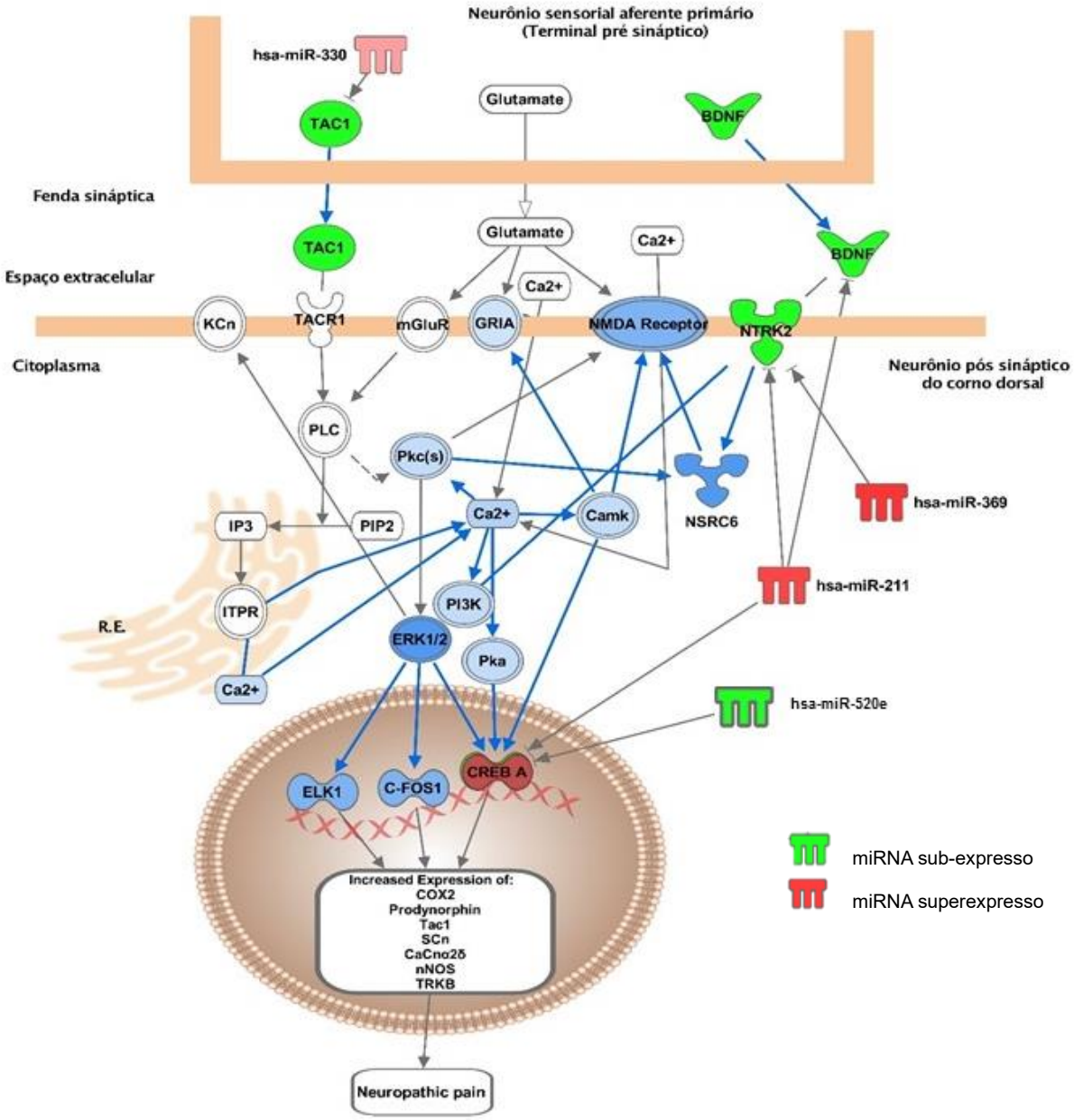


Figura 28. Representação gráfica da via canônica da *Neuropathic Pain Signaling In Neurons*, incluindo as moléculas nodais relacionadas aos microRNAs diferencialmente expressos detectados no grupo HAM no presente estudo. Essa via está relacionada a respostas imunológicas deflagradas por uma neuroinflamação, na qual há regulação positiva de citocinas pró-inflamatórias, podem contribuir para o desenvolvimento da dor neuropática.

4.5.4. Análise da correlação entre os miRNAs desregulados no grupo HAM comparados ao grupo ASS com a carga proviral e e expressão dos genes virais (*tax* e *HBZ*)

Para avaliar a correlação entre os miRNAs de expressão significativamente diferenciada *vs.* carga proviral (miRNAs *vs.* CPV) e entre os miRNAs de expressão diferenciada *vs.* expressão de *tax* (miRNAs *vs.* RNAm Tax) e de *HBZ* (miRNAs *vs.* RNAm HBZ) foi utilizado o teste de *Spearman*, considerando significância de 0,05. Para essa análise, foram selecionados os 10 miRNAs desregulados identificados no grupo HAM (*vs.* ASS) (super-expressos: hsa-miR-133a, -148a, -211, -330, -369-5p, -486 e -889 e sub-expressos: hsa-miR-520b, -520e e -566). Foram calculadas as correlações entre miRNAs *vs.* CPV alta, miRNAs *vs.* CPV baixa, miRNAs *vs.* RNAm Tax e miRNAs *vs.* RNAm HBZ tanto no grupo ASS quanto no grupo HAM.

No grupo de infectados por HTLV-1 (ASS + HAM), quando correlacionados os valores de $2^{-\Delta Ct}$ dos miRNAs *vs.* valor absoluto da CPV alta e baixa, não foi demonstrada nenhuma correlação. No entanto, quando desagregados os grupos de infectados (ASS e HAM), observou-se correlação positiva de CPV alta do grupo ASS com os miRNAs superexpressos hsa-miR-133a (r = 0,825; *p*=0,313), hsa-miR-148a (r = 0,880; *p*=0,083) e hsa-miR-211 (r = 0,834; *p*=0,237) e correlação negativa com o miRNA sub-expresso hsa-miR-520b (r = -0,822; *p*=0,301), porém a análise não foi significativa. No grupo HAM, por sua vez, observou-se correlação positiva moderada de CPV alta com o miRNA superexpresso hsa-miR-211 (r = 0,721; *p*=0,023) e fraca com os miRNAs superexpressos hsa-miR-133a (r = 0,620; *p*=0,060) e -330 (r = 0,610; *p*=0,060).

Dentre os indivíduos do grupo ASS, foi mostrada correlação negativa de CPV baixa com o miRNA superexpresso hsa-miR-369-5p (r = -0,645; *p*=0,036), apresentando significância estatística, e, analogamente, correlação negativa (r = -0,679; *p*=0,303) entre o miRNA superexpresso hsa-miR-889 e CPV baixa. Adicionalmente, verificou-se que o hsa-miR-520e (sub-expresso) apresentou correlação negativa moderada (r = -0,600; *p*=0,759) para CPV baixa (**Tabela 10**).

Ao correlacionar os miRNAs de expressão diferenciada com a expressão dos genes virais (*tax* e *HBZ*) no grupo de infectados por HTLV-1 (ASS + HAM), não foi demonstrada nenhuma correlação. Entretanto, desagregados os grupos, observou-se correlação positiva entre RNAm Tax e o miRNA superexpresso hsa-miR-211 (r = 0,809; *p*=0,021) com valor de *p* significativo no grupo ASS. Não foi demonstrada nenhuma correlação entre miRNAs *vs.* RNAm Tax no grupo HAM. A expressão de HBZ no grupo ASS mostrou-se positivamente correlacionada com os miRNAs superexpressos hsa-miR-148a (r = 0,800; p=0,333) e hsa-miR-889 (r = 0,889; p=0,083), porém a análise não foi significativa. E por fim, no grupo HAM, a expressão de *HBZ* mostrou-se correlacionada positivamente com o hsa-miR-330 (r = 0,802; p=0,302) sem valor de p significativo (**Tabela 11**).

Tabela 10. Correlação da expressão de microRNAs com a carga proviral de HTLV-1.

MicroRNA	Carga proviral											
	Alta (>51 cópias/10^3 células)						Baixa (≤50 cópias/10^3 células)					
	ASS + HAM		ASS		HAM		ASS + HAM		ASS		HAM	
	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor
microRNAs sub-expressos detectados no grupo HAM (*vs.* ASS)												
hsa-miR-133a	0,360	*p*=0,187	**0,825**	***p*=0,313**	**0,620**	***p*=0,060**	-0,001	*p*=0,996	-0,082	*p*=0,772	0,500	*p*>0,999
hsa-miR-148a	0,15	*p*=0,593	**0,880**	***p*=0,083**	0,463	*p*=0,154	0,143	*p*=0,570	0,257	*p*=0,353	0,500	*p*>0,999
hsa-miR-211	-0,121	*p*=0,666	-0,200	*p*=0,916	**0,721**	***p*=0,023**	0,294	*p*=0,251	0,317	*p*=0,248	-	-
hsa-miR-330	0,278	*p*=0,313	0,400	*p*=0,750	**0,610***	***p*=0,060**	-0,149	*p*=0,553	-0,025	*p*=0,933	-0,500	*p*=0,999
hsa-miR-369-5p	-0,090	*p*=0,796	-0,500	*p*>0,999	0,535	*p*=0,235	-0,522	*p*=0,070	**-0,645**	***p*=0,036**	-	-
hsa-miR-486	0,157	*p*=0,575	0,092	*p*=0,743	0,445	*p*=0,173	-0,120	*p*=0,633	-0,333	*p*=0,427	0,500	*p*>0,999
hsa-miR-889	0,260	*p*=0,346	**0,834**	***p*=0,237**	0,390	*p*=0,236	-0,370	*p*=0,130	-0,185	*p*=0,506	**-0,679**	***p*=0,303**
microRNAs sub-expressos detectados no grupo HAM (*vs.* ASS)												
hsa-miR-520b	-0,228	*p*=0,411	**-0,822**	***p*=0,301**	-0,072	*p*=0,838	-0,131	*p*=0,604	-0,203	*p*=0,465	0,059	*p*=0,293
hsa-miR-520e	-0,171	*p*=0,540	-	-	-0,081	*p*=0,817	-0,211	*p*=0,399	-0,203	*p*=0,465	**-0,600**	***p*=0,759**
hsa-miR-566	-0,017	*p*=0,954	-	-	0,045	*p*=0,903	-0,455	*p*=0,057	-0,446	*p*=0,097	0,500	*p*>0,999

Legenda. A análise de correlação de *Spearman* foi realizada com o valor de Ct ($2^{-\Delta Ct}$) dos miRNAs significativamente desregulados cruzados com valores de carga proviral alta e baixa, utilizando o pacote estatístico *Graphpad Prism* v. 7.0, sendo $p<0,05$. O valor de r positivo indica que a expressão de miRNAs é diretamente proporcional aos demais testes correlacionados. Por sua vez, os miRNAs que apresentam valor de r negativo indica que a correlação é inversa. Destacados em vermelho estão os miRNAs e valores de R e *p* obtidos de correlações positivas ou negativas encontradas.

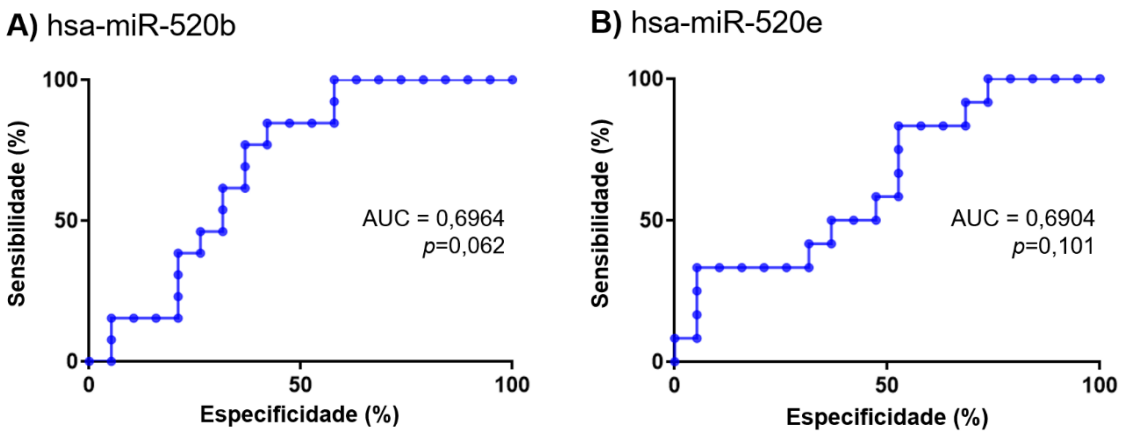
Tabela 11. Correlação da expressão de microRNAs com a expressão de RNAm Tax e RNAm HBZ de HTLV-1.

MicroRNA	Expressão gênica											
	tax						*HBZ*					
	ASS + HAM		ASS		HAM		ASS + HAM		ASS		HAM	
	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor	r	P-valor
microRNAs sub-expressos detectados no grupo HAM (*vs.* ASS)												
hsa-miR-133a	-0,085	*p=0,735*	0,190	*p=0,664*	0,078	*p=0,838*	0,428	*p*=0,299	0,400	*p=0,750*	0,200	*p*=0,916
hsa-miR-148a	-0,093	*p*=0,710	-0,214	*p*=0,619	-0,248	*p*=0,491	0,166	*p*=0,703	**0,800**	***p*=0,333**	0,200	*p*=0,916
hsa-miR-211	-0,441	*p=0,078*	0,016	*p=0,981*	**0,809***	***p=0,021****	-0,261	*p*=0,536	-0,400	*p=0,750*	-0,500	*p*>0,999
hsa-miR-330	0,011	*p=0,964*	-0,142	*p=0,750*	0,163	*p=0,656*	0,0714	*p*=0,882	0,200	*p=0,916*	**0,802**	***p*=0,302**
hsa-miR-369-5p	0,098	*p*=0,750	0,285	*p*=0,556	0,200	*p=0,713*	0,178	*p*=0,713	0,500	*p>0,999*	-	-
hsa-miR-486	0,073	*p=0,772*	-0,333	*p=0,427*	0,430	*p=0,218*	-0,071	*p*=0,882	0,200	*p=0,916*	0,400	*p*=0,750
hsa-miR-889	0,178	*p*=0,478	-0,071	*p*=0,882	-0,090	*p=0,811*	0,214	*p*=0,619	**0,869**	***p=0,083***	-0,400	*p*=0,750
microRNAs sub-expressos detectados no grupo HAM (*vs.* ASS)												
hsa-miR-520b	-0,069	*p=0,785*	-0,023	*p=0,976*	0,527	*p=0,123*	-0,547	*p*=0,171	-0,400	*p=0,750*	0,200	*p*=0,916
hsa-miR-520e	0,378	*p*=0,121	0,309	*p*=0,461	0,345	*p*=0,330	-0,357	*p*=0,389	0,700	*p*=0,426	-	-
hsa-miR-566	-0,112	*p*=0,656	-0,190	*p*=0,664	-0,369	*p*=0,400	0,295	*p*=0,243	0,600	*p*=0,416	0,476	*p*=0,750

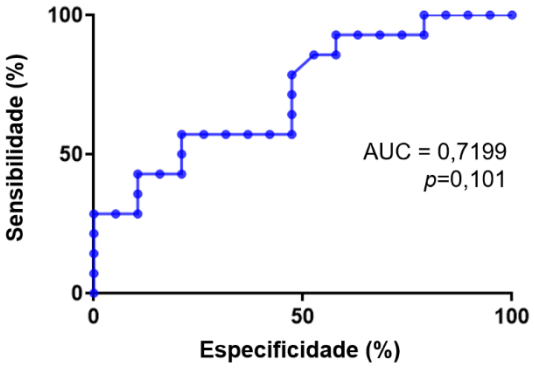
Legenda. A análise de correlação de *Spearman* foi realizada com o valor de Ct ($2^{-\Delta Ct}$) dos miRNAs significativamente desregulados cruzados com os valores de Ct ($2^{-\Delta Ct}$) dos RNAm de *tax* e *HBZ*, utilizando o pacote estatístico *Graphpad Prism* v. 7.0, sendo $p<0,05$. O valor de r positivo indica que a expressão de miRNAs é diretamente proporcional aos demais testes correlacionados. Por sua vez, os miRNAs que apresentam valor de r negativo indica que a correlação é inversa. Destacados em vermelho estão os miRNAs e valores de R e *p* obtidos de correlações positivas ou negativas encontradas.

4.5.5. Avaliação de intensidades de expressão de microRNAs específicos como potenciais biomarcadores para diferenciação entre estado de portador assintomático de infecção por HTLV-1 e HAM/TSP

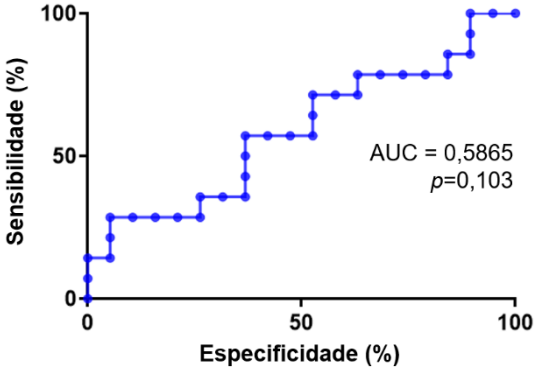
Para avaliar a capacidade da intensidade de expressão de miRNAs específicos ser utilizada como biomarcador distintivo entre infecção assintomática por HTLV-1 e HAM/TSP, foram selecionados os 10 miRNAs diferencialmente expressos no grupo HAM (*vs.* ASS) [hsa-miR-133a, -148a, -211, -330, -369-5p, -486 e -889 (superexpressos) e hsa-miR-520b, -520e e -566 (superexpressos)], que apresentaram significância estatística, para construção de curva ROC. O hsa-miR-566 demonstrou melhor acurácia entre os miRNAs avaliados para tal distinção, uma vez que apresentou uma área sob a curva (AUC) de 0,7199 (IC95% 0,5435 a 0,89630; p=0,101). Assim, obtendo-se valores de $\Delta Ct_{miR\text{-}566} < 30,25$ seria possível o distinguir um portador ASS de uma paciente com HAM, considerando 78,57% de sensibilidade e 52,63% de especificidade (**Figura 29C**).



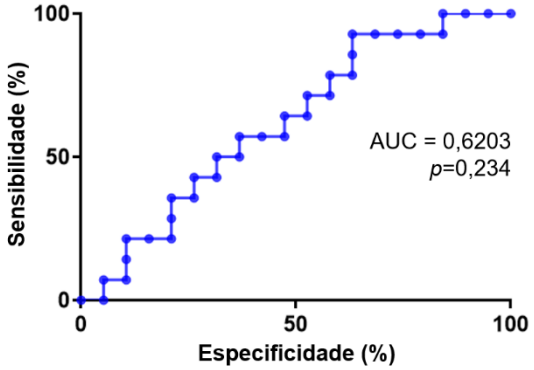
C) hsa-miR-566



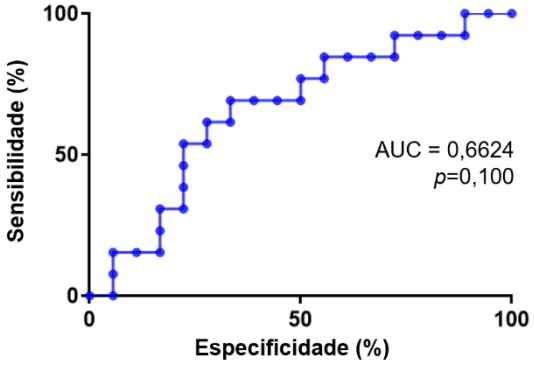
D) hsa-miR-133a



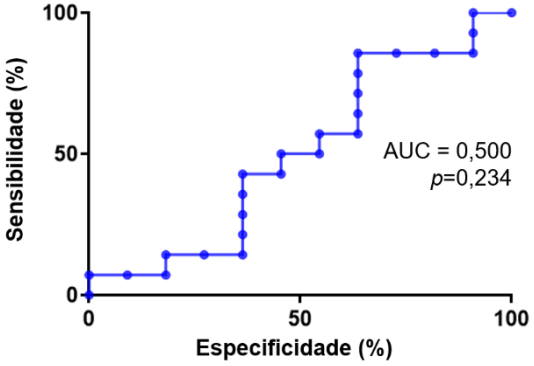
E) hsa-miR-148a



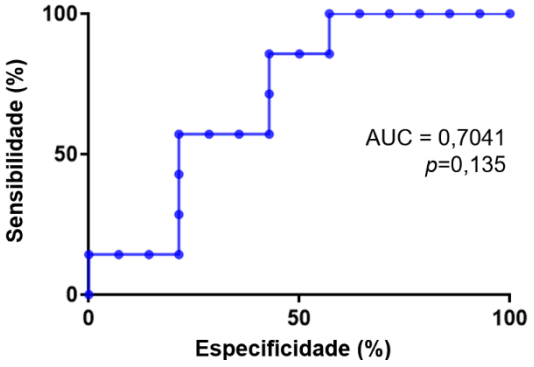
F) hsa-miR-211



G) hsa-miR-330



H) hsa-miR-369-5p



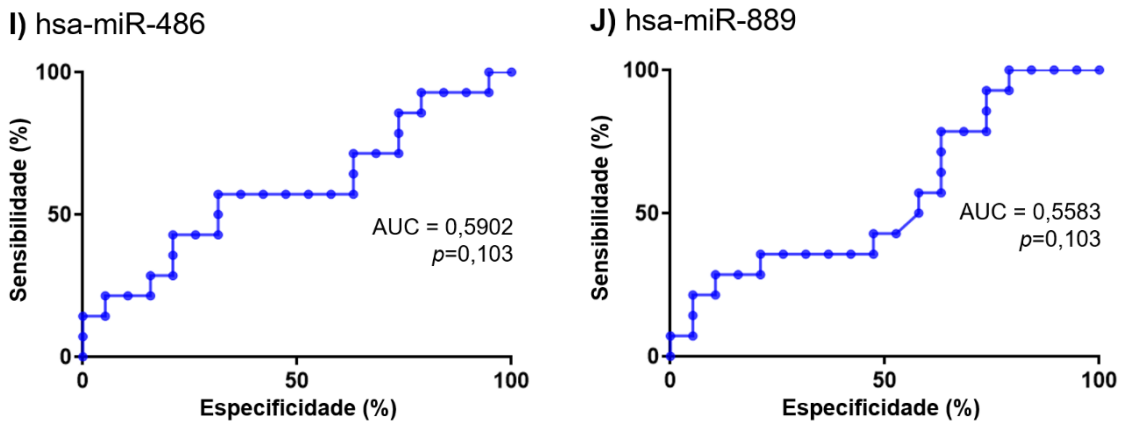


Figura 29. Curva ROC com os microRNAs selecionados para avaliação da distinção de portadores assintomáticos de infecção por HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP. As curvas foram construídas com base na expressão de miRNAs diferenciais entre os grupos ASS e HAM. A área sob a curva esta representada no gráfico demonstra quão específico e sensível é o teste.

Diante dos resultados obtidos, foi gerada a rede HAM pelo IPA, que apresenta a distribuição e atuação das moléculas nodais da rede [(Família das Fosfodiesterases (PDE) e Família das Fosfatases (PPP)] e os miRNAs ligados à mesma. Dentre os miRNAs, destacam-se os miRNAs superexpressos hsa-miR-211 e o hsa-miR-330, que apresentam papel inibitório em nível citoplasmático sobre PPPs e PDEs, fosforilando a via e ativando outras vias como NF-κb, e ainda, que atuam em nível nuclear inibindo a proteína IKZF2, relacionada a vias de processos de regulação do ciclo celular e de processos inflamatórios (**Figura 30**).

- **Rede da HAM/TSP**

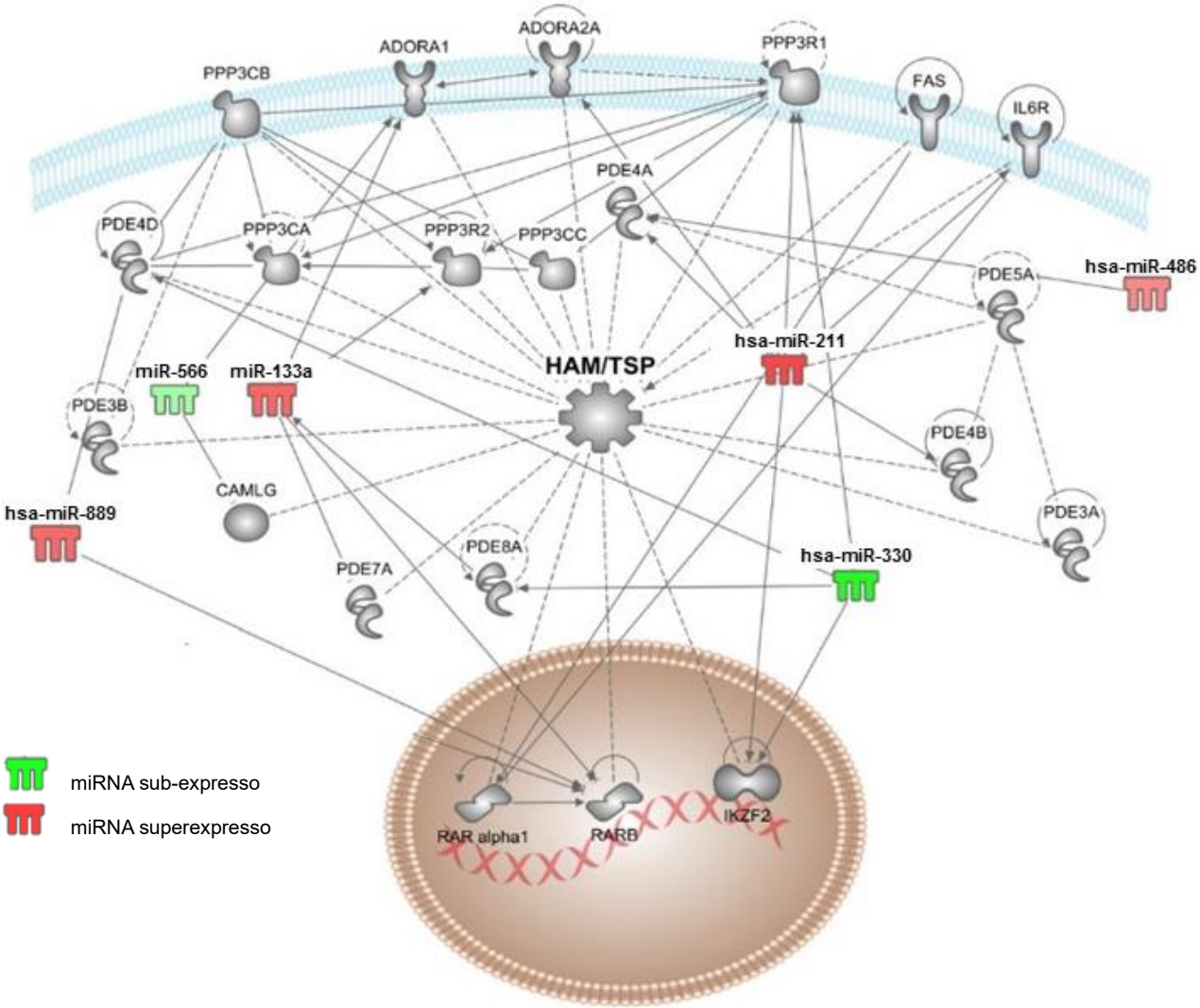


Figura 30. Representação gráfica da rede da HAM/TSP, incluindo as moléculas nodais mais relacionadas aos microRNAs diferencialmente expressos detectados no presente estudo. Os genes são representados como “nós” (do inglês, node) e as relações biológicas representadas como “linhas”. Todas as “linhas” foram estabelecidas com base nas informações canônicas armazenadas no IKB.

5. DISCUSSÃO

Perfis de expressão de miRNAs têm sido reconhecidos como “assinaturas fenotípicas” muito relevantes em diversas doenças, sendo até, mais informativos do que ensaios de expressão em larga escala, contendo milhares de genes codificantes (Calin e Croce, 2006; Jones et al., 2012). Assim, alterações identificadas na expressão de miRNAs do hospedeiro podem desvelar mecanismos relacionados à patogênese de doenças.

O papel dos miRNAs nas infecções virais tem sido amplamente estudado, uma vez que podem controlar diversas vias celulares do hospedeiro, direcionando a infecção viral, ao induzir ou reprimir sua replicação ou ainda, regular mecanismos que culminam no desenvolvimento de doenças a elas associadas.

Especificamente na infecção por HTLV-1, pesquisas conduzidas na última década, têm demonstrado diversos miRNAs com expressão alterada, seja em linhagens celulares (D' Agostino et al., 2012; Rahman et al., 2012; Ruggero et al., 2014), em PBMCs (Pichler et al., 2008; Yeung et al., 2008; Ghisi et al., 2011) e mais raramente, em células T CD4+ infectadas (Tomita et al., 2012; Nicolete et al., 2012). As escassas análises *in silico* realizadas até o presente momento indicam que esses miRNAs desregulados parecem estar envolvidos na regulação de genes com expressão alterada nessas mesmas amostras (Young et al., 2008; Belon et al., 2009; Nicolete et al., 2012; Otaguiri, 2013).

No presente trabalho, foi realizado um estudo da expressão de 754 miRNAs e predição dos seus RNAm alvo em 19 portadores assintomáticos de infecção por HTLV-1 e 17 pacientes com HAM/TSP. Diferentemente dos raros estudos anteriores de expressão de miRNAs conduzidos na infecção por HTLV-1, que pesquisaram a expressão em linhagens celulares e/ou células mononucleares infectadas do sangue periférico, no atual estudo foi feita a avaliação da expressão, utilizando apenas linfócitos T CD4+ e T CD8+, uma vez que essas são as células preferencialmente infectadas pelo vírus. A resposta dos linfócitos T CD4+ tem importância central no direcionamento da atividade de linfócitos T CD8+ e de linfócitos B. Sabe-se que pacientes com HAM/TSP exibem maior frequência de linfócitos T CD4+ específicos para o HTLV-1 (Nose et al., 2007), com predominância do fenótipo T-helper 1 (Th1) e maior secreção espontânea de citocinas próinflamatórias e neurotóxicas, tais como, IFN-γ e TNF-α (Goon et al., 2003), em comparação com células de portadores assintomáticos.

Com vistas a avaliar o perfil de expressão dos miRNAs nessa infecção retroviral, bem como predizer o papel dessas moléculas no contexto da HAM/TSP, foram constituídos três grupos de interesse (CN, ASS e HAM) e quatro subgrupos, desagregados em relação à carga proviral apresentada, como alta ou baixa (ASS_B, ASS_A, HAM_B e HAM_A).

De modo distintivo, verificou-se que os miRNAS estudados apresentaram expressão significativamente diferente, tanto no grupo ASS (superexpressos = 4 e sub-expressos = 14), como no grupo HAM (superexpressos = 5 e sub-expressos = 10), quando comparados ao grupo

CN. Mais pormenorizadamente, a infecção por HTLV-1 resultou em alteração da expressão dos hsa-miR-520e, -27a, -589 e -320B (superexpressos) no grupo ASS e dos hsa-miR-625, -139-5p, -126a-3p, -211, -135a, -598, -219a-1-3p, -381, -425-5p, -516-3p, -302c, -1253, -627 e -588 (sub-expressos). Por outro lado no grupo HAM, mostraram-se superexpressos (hsa-miR-26a-2, -449b, -641, -708 e -938) e (hsa-miR-412, -518b, -548-5p, -573, -576-5p, -588, -598, -618, -627 e -1225-3p). Esses achados indicam que esses miRNAs são potenciais candidatos a marcadores de infecção por HTLV-1.

Em contraste, quando comparado ao grupo ASS, o grupo HAM apresentou um número de miRNAs superexpreessos maior do que os sub-espressos (super-expressos = 7 e sub-expressos = 3), sendo 10 miRNAs, portanto, potenciais candidatos a marcadores distintivos da doença HAM/TSP. Os hsa-miR-369-5p e -211 foram os mais superexpressos (*fold-change* = 2,9 e 2,7, respectivamente) e os hsa-miR-520e e -566 os mais sub-expressos (*fold-change* = -7,3 e -3,0, respectivamente) neste grupo de doentes. Surpreendentemente, nenhum miRNA previamente relatado como diferencialmente expresso na infecção por HTLV-1 foi detectado no presente estudo. A propósito, há de se ressaltar que das raras investigações já conduzidas sobre o perfil de expressão de miRNAs em indivíduos infectados por HTLV-1 (Belon et al., 2009; Nicolete et al., 2012), o presente estudo foi o que avaliou o maior número de miRNAs. Adicionalmente, neste estudo a desregulação foi definida de modo preciso, com nível de significância <0,05 e *fold-change* de pelo menos 1,5 vezes.

Os primeiros trabalhos que relacionaram a modulação da expressão

de miRNAs humanos e a infecção pelo HTLV-1 foram conduzidos em 2008 (Pichler et al; Yeung et al.). No primeiro estudo citado, demonstrou-se que os hsa-miR-24, -146a e -155 e -221 apresentavam aumento na sua expressão em uma série de linhagens celulares, derivadas de linfócitos *ex vivo* de pacientes com ATL, com HAM/TSP e em células transformadas por HTLV-1 ou Tax, enquanto que o miR-223 estava com sua expressão reprimida, quando comparado com a expressão do grupo controle. Já no estudo realizado por Yeung et al. (2008) foram observados três miRNAs desregulados: hsa-miR-18a, -93 e -130b, que apresentaram superexpressão em linhagem celular de ATL e em amostras de PBMC de pacientes com ATL aguda, quando comparados com grupo controle. Mais recentemente, Nicolete e cols. (2012) detectaram superexpressão do hsa-miR-125b em células T CD4+ infectadas de portadores assintomáticos, quando comparados ao grupo HAM. Esses três estudos demonstraram que a infecção por HTLV-1 modula a expressão de miRNAs humanos. Com base nessas evidências, sugeriu-se que o desarranjo dos miRNAs do hospedeiro, causado pelo retrovírus, pudesse influenciar no estabelecimento da infecção e/ou no desenvolvimento de doenças a ela associadas.

Com a intenção de avaliar em que medida o perfil de expressão de miRNAs dos grupos estudados seria capaz de distinguí-los entre si, neste estudo foi realizada a análise por agrupamento hierárquico dos miRNAs avaliados. Embora o perfil de expressão de miRNAs obtido não tenha sido capaz de segregar as amostras em clados de acordo com os grupos estudados (CN, ASS e HAM), as alterações detectadas, de fato, podem refletir

consequências do quadro infeccioso no momento da coleta da amostra, o qual pode divergir de indivíduo para indivíduo, quando se considera a história natural da infecção. Em séries de casos prevalentes de infecção, como neste estudo, geralmente se desconhece o momento de aquisição do vírus, conferindo-lhes grande heterogeneidade. Outros fatores, como a idade e sexo do indíviduo e carga proviral alta ou baixa foram considerados na construção do *heat map*, contudo o mesmo permaneceu indistinguível (dados não mostrados).

Adicionalmente, a curva ROC foi empregada como ferramenta para verificar qual(is) dos miRNAs diferencialmente expressos apresentava maior poder disitintivo ao comparar a sua expressão no grupo ASS e HAM, uma vez que a diferenciação entre portadores assintomáticos de infecção por HTLV-1 e pacientes com HAM/TSP é crucial para o aconselhamento clínico e definição do prognóstico dos pacientes. Essa ferramenta computacional vem sendo usada em inúmeros estudos relacionados à expressão de miRNAs, na tentativa de distinguir grupos de indivíduos de acordo com as suas condições clínicas (Mar-Aguilar et al., 2013; Wang et al., 2014; Shalaby et al., 2016). O emprego da análise ROC foi recentemente realizado na avaliação do perfil de expressão de miRNAs em tumores adenocorticais benignos e malignos (Bezerra-Neto, 2014). Foi demonstrado que o hsa-miR-1290 apresentou uma área sob a curva (AUC) de 1,0, o que indicou que intensidades de expressão menores que 10,3 poderiam ser sugestivas de diagnóstico de um adenoma com 100% de sensibilidade e especificidade no grupo adulto estudado.

Quando empregada neste estudo, foi avaliado o poder distintivo de 10 miRNAs diferencialmente expressos no grupo HAM (*vs.* ASS). Embora os resultados dessa análise não tenham sido distintivos, a ampliação do número de amostras estudadas é necessária para confirmação dos resultados, uma vez que o hsa-miR-486 apresentou uma área sob curva de 0,791.

Após a avaliação do perfil de expressão de miRNAs no atual estudo, foram selecionados 10 miRNAs desregulados identificados no grupo HAM (*vs.* ASS) (super-expressos: hsa-miR-133a, -148a, -211, -330, -369-5p, -486 e -889 e sub-expressos: hsa-miR-520b, -520e e -566) para a análise *in silico* de predição de alvos. Como critério de seleção, recrutaram-se novamente apenas os miRNAs diferencialmente expressos com significância estatística ($p<0,05$) e que apresentassem pelo menos *fold-change* de 1,5 vezes.

A análise de redes gênicas e suas interrelações com miRNAs permite uma melhor compreensão dos achados de estudos moleculares. Na análise *in silico*, considera-se a possibilidade de haver muitos alvos para cada miRNA. Dessa forma, a predição de gene alvo torna-se complexa, exigindo ferramentas bioinformáticas para sua predição. Assim, os algoritmos computacionais têm sido essenciais para identificar esses alvos candidatos. Cada um dos algoritmos emprega uma variedade de princípios e características para predição e reconhecimento do alvo do miRNA, como por exemplo, a utilização de padrões de pareamento de base, a análise termodinâmica do *duplex* formado pelos miRNA/gene-alvo, a conservação do sítio alvo entre espécies e a acessibilidade do sítio alvo. No atual estudo foi utilizado o programa IPA, que integra os algoritmos *PicTar*, *miRanda*,

T*argetScan* e *DIANA-microT*, para a análise dos potencias alvos dos miRNAs desregulados e das redes gênicas potencialmente envolvidas. O programa cria redes gênicas que auxiliam na interpretação de dados, assim como, possibilitam a exploração de mecanismos celulares envolvidos. Para os 10 miRNAs desregulados encontrados no grupo HAM (*vs.* ASS), o IPA predisse de dezenas a milhares de genes-alvo. Com base apenas nos alvos experimentalmente validados e com predição altamente confiável que constam na base de dados IKB, destacam-se os hsa-mir-520e (n=918 alvos), -211 (n=728), -133a (n=703), -486 (n=223), -566 (n=95), -330 (n=47), -369-5p (n=18), -889 (n=5), desregulados no grupo HAM (*vs.* ASS). Diversos estudos, que realizam a avaliação funcional dos miRNAs em infecções virais e parasitárias e em doenças neoplásicas, elegem o IPA para predição de alvos e construção de vias celulares relacionadas às moléculas-alvo dos miRNAs (vias canônicas) (Ferreira et al, 2014; Neto-Bezerra, 2014; Navarro, 2014; Nair e Y2, 2016; Sun e Ballard, 2016), embora a licença anual para uso dessa ferramenta seja onerosa.

Uma vez preditos os genes dos RNAm alvo do presente estudo, vias canônicas foram construídas. A observação de que vias canônicas relacionadas a câncer estavam entre as mais afetadas pelos miRNAs desregulados pela infecção por HTLV-1 no atual estudo, justifica-se, tendo em vista o grande volume de estudos relacionados a neoplasias que são conduzidos no mundo. Esses geram uma gama de informações considerável sobre as vias relacionadas a essa afecção e que podem também ser comuns a outras doenças. Como o banco de dados desses algoritmos computacionais

são gerados a partir dos resultados de estudos, geralmente validados, o grande volume de vias relacionadas a câncer sobrepõe-se ao de vias específicas relacionadas a outras doenças. Neste estudo, as vias mais associadas aos miRNAs desregulados do grupo HAM (elencadas pelo IPA) e as mais relacionadas à imunopatogênese da HAM/TSP (levantamento bibliográfico), tiveram detalhadas, então, as suas redes gênicas e interações com os miRNAs diferencialmente expressos.

Sabe-se que a proteína Tax está altamente envolvida nos mecanismos que levam ao desenvolvimento/progressão da HAM/TSP. Tax regula vias celulares distintas, incluindo as de fatores de transcrição, tais como CREB/ATF, AP-1, SRF e NF-κb, que envolvem as proteínas contendo o domínio PDZ, Rho-GTPases, JAK/STAT e TGF-βeta (Yoshida, 2001). Em pacientes com HAM/TSP existe uma maior quantidade de células T CD4+ que expressam *tax*, sugerindo que, possivelmente, uma maior quantidade dessa proteína está sendo traduzida (Saito et al., 2009). Essa alta expressão de *tax* faz com que haja imortalização e expansão de células infectadas com o vírus. No contexto da ação patogênica dessa proteína viral, destaca-se a ativação do fator nuclear NF-κb e subsequente estímulo de proliferação e ativação celulares (Cross et al., 1987). Tal ativação pode ocorrer: i) pela ligação da proteína Tax diretamente em acentuadores (do inglês, *enhancers*), que são sequências de DNA que aumentam a afinidade da maquinaria de transcrição por um certo promotor, fazendo com que Tax controle a transcrição de determinados genes; ou ii) pela ligação de Tax no fator de transcrição IkB ligado a NF-κb, determinando degradação do complexo, e,

consequentemente, a liberação e ativação do NF-κb (Boxus et al., 2008).

Pichler et al. (2008) e Yeung et al. (2008) iniciaram estudos com Tax e miRNAs, ao avaliarem a expressão de miRNAs humanos no controle da atividade dessa proteína pela técnica de *Microarray* e utilizando ferramentas bioinformáticas. Os pesquisadores demonstraram que o hsa-miR-146a pode atuar diretamente sobre a proteína Tax via NF-κb (Pichler et al., 2008) e que os hsa-miR-93 e -130b, que têm o gene TP53INP1 como alvo, também são influenciados por Tax, favorencendo a persistência viral e transformação de células do hospedeiro (Yeung et al., 2008). Diversos outros pesquisadores indicaram a influência de Tax na via NF-κb via desregulação de miRNAs na infecção por HTLV-1 (Azran-Shaish et al., 2008; Sun e Ballard, 1999; Zhi et al., 2011).

Os resultados deste estudo ressaltaram a importância da via NF-κb, a partir da análise pelo IPA, que apontou ser essa uma das vias canônicas identificadas a partir da expressão diferenciada no grupo HAM (*vs.* ASS) dos miRNAs estudados. Sabe-se que os genes IRAK e TRAF6 participam da cascata de ativação de NF-κb como moléculas nodais. Na via NF-κb gerada no presente trabalho, pôde-se observar a ação do hsa-miR-486 (superexpresso), inibindo a expressão de IRAK3. Pouco expressa, IRAK3 ativa a molécula adaptadora MYD88, que, por sua vez, recruta as quinases IRAK1 e IRAK4. IRAK4 fosforila IRAK1 após dissociação de MYD88 e induz a ativação de TRAF6. Em seguida, TRAF6 ativa um complexo de quinases e proteínas ligadas, que fosforila Ikb e permite a liberação de NF-κb, resultando na fosforilação de várias vias de maneira indireta, e consequente indução da

expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória, tais como os que codificam TNF-α, IL-2, IL-6, IL-1β e IL-12 (Cross et al., 1987), condições essas envolvidas na patogênese da HAM/TSP. Além de inibir a ação de IRAK3, em nível nuclear, o hsa-miR-486 (detectado como superexpresso no presente trabalho) inibe a expressão da molécula GSK3B, que pouco expressa, ativa o complexo Rel/NF-κb, culminando na resposta proinflamatória. Ressaltando, ainda, o potencial papel distintivo desse miRNA, além de modular diretamente a expressão de IRAK3, apresentou o melhor desempenho na análise ROC, mostrando-se estar diretamente envolvido nos mecanismos que distinguem os grupos de infectados.

A busca por correlações foi uma estratégia empregada neste trabalho com o intuito de filtrar o grande volume de dados potencialmente relevantes no contexto biológico estudado. Para tanto, a CPV e a expressão dos genes virais (*tax* e *HBZ*) foram os parâmetros selecionados para serem correlacionados com a expressão dos 10 miRNAs diferencialmente detectados.

Diversos pesquisadores associam a elevação da CPV com o desenvolvimento/progressão da HAM/TSP. Estudos prévios confirmaram que a CPV de HTLV-1 é significativamente maior em pacientes com HAM/TSP, quando comparados com portadores assintomáticos (Jeffery et al., 1999; Manns et al., 1999; Yamano et al., 2002). Corroborando tais dados da literatura, os resultados de CPV obtidos neste trabalho demonstraram que o grupo HAM apresentou mediana de CPV 6,3 vezes à do grupo ASS.

Adicionalmente, ao correlacionar a expressão dos 10 miRNAs

diferencialmente expressos com a CPV alta no grupo ASS, observou-se que os hsa-miR-133a, -148a e -889 apresentaram correlação positiva para CPV alta. As redes gênicas identificadas para esses miRNAs no presente estudo mostraram que dois deles, hsa-miR-133a e hsa-miR-889, afetam as vias PKA e NGF, simultaneamente, e ERK5 e EPHRIN (hsa-miR-133a) e NF-κb (hsa-miR-889), isoladamente. Essas vias estão relacionadas a mecanismos de sobrevivência celular, regulando a proliferação e diferenciação de células e a processos inflamatórios, envolvendo a resposta imune e a fosforilação de grupos específicos de serina e treonina. A correlação positiva identificada sugere que a superexpressão desses miRNAs em portadores de HTLV-1 assintomáticos com CPV alta pode representar um alto risco para o desenvolvimento da mielopatia, o que poderia ser validado em estudos longitudinais posteriores. Embora se estime que a maioria dos portadores assintomáticos assim permanecerão ao longo de toda sua vida, mesmo com flutuações na CPV, esse grupo de infectados por HTLV-1 deve ser monitorado periodicamente, visto que podem estar sob maior risco de adoecimento (Kamihira et al., 2003; Furtado et al., 2012; Satou e Matsuoka et al., 2012).

Por outro lado, correlacionando expressão diferencial de miRNAs com CPV alta no grupo HAM, apenas o hsa-miR-211 apresentou correlação positiva forte, as demais foram moderadas. Esse miRNA mostrou-se capaz de afetar todas as seis vias preditas pelo IPA como relacionadas à desregulação de miRNAs no grupo HAM, quando comparada ao grupo ASS. Esse achado indica que a superexpressão do hsa-miR-211 em pacientes com HAM/TSP que apresentam alta CPV pode ser indicativo da doença nesse subgrupo.

Dado que este estudo teve delineamento transversal, não há como inferir se sua expressão poderia ter valor prognóstico na evolução da doença.

Em relação aos miRNAs sub-expressos no grupo ASS (*vs.* HAM) foi identificada correlação negativa da expressão do hsa-miR-520b com a CPV no subgrupo com CPV alta. De fato, analisando as redes gênicas às quais esse miRNA pode estar relacionado, observou-se que afeta de forma acentuada, uma única via, a ERK5, que se relaciona com mecanismos de sobrevivência celular, regulando a proliferação e diferenciação celular. Essa via canônica apresentou o maior *overlap* (33%) do número de moléculas frente à predição para os miRNAs que se apresentaram desregulados no atual estudo. Na via ERK5, o hsa-miR-520b (sub-expresso) ativa os genes IL6ST, PTPN11 e WNK1, que participam diretamente da ativação dessa via. Uma vez que o grupo ASS com CPV alta constitui um grupo de risco para o desenvolvimento da HAM/TSP, deve-se atentar para o possível papel patogenético dos miRNAs diferencialmente expressos e anteriormente discutidos, estejam esses superexpressos (hsa-miR-133a, -148a e -889), ou sub-expressos (hsa-miR-520b) nesse subgrupo.

Ao lado disso, avaliou-se a correlação entre a expressão diferencial de miRNAs e a intensidade de expressão dos genes virais (*tax* e *HBZ*) nos grupos ASS e HAM. Foi observada correlação positiva forte entre a expressão do hsa-miR-211 e a expressão de *tax* no grupo HAM. Como discutido anteriormente, além de estar correlacionado com a expressão de *tax*, no grupo HAM, esse miRNA também exibiu correlação positiva com a CPV no subgrupo de CPV alta. Esse mesmo miRNA revelou-se associado a todas as seis vias

canônicas construídas no presente estudo, demonstrando o quão interferente pode ser nos mecanismos imunopatogenéticos da infecção por HTLV-1. Sabe-se que a proteína Tax exerce papel crucial no desenvolvimento da mielopatia. Dessa forma, avaliar o quanto o gene *tax* está sendo expresso e se a intensidade de sua expressão está correlacionada à expressão de miRNAs, bem como analisar as redes gênicas a eles relacionadas pode indicar alguns mecanismos pelos quais a interação miRNA-moléculas nodais-vias canônicas pode favorecer ou não o desenvolvimento da HAM/TSP. Ao correlacionar a expressão de *HBZ* e de miRNAs diferenciais do atual estudo, o grupo ASS apresentou correlação positiva forte para as intensidades de expressão dos hsa-miR-148a e hsa-miR-889. Esses miRNAs estão relacionados às vias PKA, NF-κb e NGF, envolvidas em processos inflamatórios, da resposta imune e de sobrevivência e proliferação celular. Já no grupo HAM, foi encontrada correlação positiva forte entre a expressão de *HBZ* com a de hsa-miRNA-330. Embora a expressão desse miRNA não tenha exibido correlação com a CPV, nem com a expressão de *tax*, verificou-se que afeta todas as vias canônicas estudadas no presente estudo, à semelhança do hsa-miR-211, destacando-se por seu papel indutor de fosforilação das PDEs e ativador das IKZF2, ambas moléculas nodais da rede HAM (**Figura 30**).

Com base no exposto no capítulo de resultados, a análise das principais redes formadas com os alvos preditos e as correlações com CPV alta estabelecidas, revelou que no subgrupo de risco ASS_A, os hsa-miR-133a

e hsa-miR-889 (superexpressos) e o hsa-miR-520b (sub-expresso) parecem desempenhar importante papel no desenvolvimento da HAM/TSP. Já no subgrupo HAM_A, os hsa-miR-211 e -330 (superexpressos), além de afetarem todas as redes gênicas geradas no presente estudo, apresentaram-se correlacionados com a expressão de *tax* e alta CPV. Na rede gênica da HAM/TSP construída pelo IPA neste estudo (**Figura 30**), fica evidente o papel crucial de dois miRNAs que se mostraram interferentes diretos da rede da mielopatia [hsa-miR-211 e hsa-miR-330 (superexpressos)], ora fosforilando toda a rede gênica em nível citoplasmático, ora ativando molécula (IKZF2) em nível nuclear. Sabe-se que o fator de transcrição NF-κb é mantido inativo na maioria das células pela interação com proteínas inibitórias da família IκBs. A ativação de NF-κb dá-se em resposta a distintos agentes (em se tratando da HAM/TSP, em resposta a Tax), ocorre por meio de rápida fosforilação das IκBs pelo complexo de proteína quinase IκB (IKK). Nessa cascata fosforilativa, como previamente descrito, a IκB é degradada e libera NF-κb, induzindo a expressão de genes que codificam citocinas e quimiocinas promotoras da resposta inflamatória, condição necessária para o desenvolvimento/progressão da HAM/TSP.

Este estudo apresentou algumas limitações que merecem ser comentadas. Por se tratar de uma doença que acomente de 2 a 5% dos indivíduos infectados por HTLV-1, o número limitado de pacientes incluídos deve-se ao rigor na inclusão de participantes sem infecções ativas concomitantes que pudessem comprometer a interpretação dos resultados.

Por se tratar de infecção de transmissão sexual ou sanguínea, é comum entre os indíviduos infectados por HTLV-1 haver co-infecções com agentes que compartilham as mesmas vias de aquisição, tais como HBV, HCV e HIV.

Poucos são os estudos que avaliaram a expressão de miRNAs em células T CD4+ e T CD8+. Os que foram assim executados, utilizaram técnicas de determinação da expressão e algoritmos para predição de alvos dos miRNAs distintos dos empregados nesta pesquisa, o que dificulta consideravelmente a comparação de resultados. Além disso, o número de informações gerado neste estudo é vultoso, tornando necessária a prévia investigação na literatura do principal desfecho do estudo com outros parâmetros laboratoriais avaliados para melhor análise dos resultados. Na verdade, Bentwich (2005) apontara a desvantagem da análise computacional, dado que os algoritmos disponíveis para predição de alvos de miRNAs resultam em um grande número de alvos preditos, dificultando, assim, a escolha dos melhores candidatos para avaliação experimental no sistema biológico estudado.

Ainda, pelo fato da concentração de proteína Tax e HBZ não ter sido determinada em paralelo à expressão dos genes que as codificam, não é possível afirmar se a ação da proteína sugerida neste estudo pode ser considerada apenas pela determinação da expressão dos seus respectivos genes.

Tendo em vista que o presente estudo teve a finalidade de descrever miRNAs com expressão diferenciada em indíviduos com HAM/TSP, sua análise baseou-se em algoritmos computacionais. Deve-se, contudo, destacar

que inferências definitivas sobre seu papel fisiopatológico nessa doença requerem a validação biológica dos miRNAs diferencialmente expressos e suas moléculas-alvo. Há que se considerar que as análises computacionais podem gerar resultados falso-positivos. Sabe-se que miRNAs e seus alvos devem estar localizados em uma mesma célula para que ocorra inibição da tradução (Mazière e Enright, 2007). Entretanto, os algoritmos computacionais não são capazes de prever qual foi o miRNA transcrito e tampouco sua quantidade em um determinado tipo celular. Dessa forma, a validação biológica dos miRNAs e seus alvos se faz necessária. Adicionalmente, diante dos potenciais miRNAs distintivos identificados neste estudo no subgrupo ASS_A e no subgrupo HAM_A, estudos longitudinais se impõem, com o intuito de monitorar a variação de sua expressão no grupo sob maior risco de desenvolvimento de HAM/TSP e no grupo de doentes que carece de um biomarcador prognóstico validado.

No presente trabalho, foi demonstrado pela primeira vez, o perfil de expressão de 754 miRNAs isolados de células T CD4+ e TCD8+ infectadas por HTLV-1. A expressão alterada de miRNAs, em alguns casos, foi correlacionada à carga proviral e à expressão dos genes virais *tax* e *HBZ*. Além disso, ao analisar as vias canônicas geradas no atual estudo se observou que IL6ST, PTPN11, MAP2K5, ELK4, AKT1, BAD, FOSL1, IRAK 3, CDC42, STAT3 e CREB A apresentaram-se como moléculas potencialmente afetadas pela expressão alterada de miRNAs no grupo HAM, quando comparado com o grupo ASS. Uma vez que o grupo ASS com CPV alta

constitui um grupo de risco para o desenvolvimento da HAM/TSP, deve-se atentar para o possível papel patogenético dos miRNAs diferencialmente expressos e anteriormente discutidos, estejam esses superexpressos (hsa-miR-133a, -148a e -889), ou sub-expressos (hsa-miR-520b) nesse subgrupo, assim como, para os hsa-miR-211 e hsa-miR-330 (superexpressos) no grupo HAM. Tais achados são úteis para o delineamento futuro de estudos longitudinais com indíviduos infectados por HTLV-1, com vistas à identificação de biomarcadores prognósticos de risco para o desenvolvimento de HAM/TSP.

6. CONCLUSÃO

- Distintos perfis de miRNAs diferencialmente expressos foram identificados nos grupos de portadores de infecção por HTLV-1, pacientes com HAM/TSP e controles.

- Não foi possível observar no dendrograma um padrão capaz de distinguir os grupos ASS, HAM e CN.

- Os hsa-miR-369-5p e hsa-miR-520e foram os miRNAs mais super- e sub-expresso, respectivamente, no grupo HAM, quando comparados ao grupo ASS.

- Nas análises *in silico* de predição de alvos IL6ST, PTPN11, MAP2K5, ELK4, AKT1, BAD, FOSL1, IRAK 3, CDC42, STAT3 e CREB A apresentaram-se como moléculas potencialmente afetadas pela expressão alterada de miRNAs no grupo HAM, quando comparado com o grupo ASS.

- Cinco miRNAs apresentaram intensidade de expressão correlacionada com carga proviral de HTLV-1 alta, sendo, no grupo HAM, um superexpresso (hsa-miR-211) e no grupo ASS, três superexpressos (hsa-miR-133a, -148a e -889) e um sub-expresso (hsa-miR-520b), que exibiu correlação negativa.

- Um miRNA superexpresso (hsa-miR-211) apresentou correlação positiva com a expressão do gene *tax* de HTLV-1 no grupo HAM.

- No grupo HAM, um miRNA superexpresso (hsa-miR-330) exibiu correlação com a expressão do gene *HBZ* de HTLV-1 e no grupo ASS, dois miRNAs superexpressos (hsa-miR-148a e hsa-miR-889) apresentaram correlação com esse gene. Ambas as correlações foram positivas.

- Um miRNA superexpresso (hsa-miR-330) exibiu correlação positiva com a expressão do gene *HBZ* de HTLV-1 no grupo HAM.

Anexo 1. Ficha de dados clínicos utilizada na anamnese e exame físico dos pacientes recrutados no presente estudo.

A) *CHECK LIST* COM CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE PARA A PESQUISA

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE			**Cód:**
NOME			
CPF			
REGISTRO HC			
DATA DA 1ª CONSULTA NO AMIN			
DATA DA ÚLTIMA CONSULTA			
DATA DE INCLUSÃO NO ESTUDO			
Telefone residencial:			
Celular:			
E-mail:			
Data de nascimento:			Idade:
Sexo:	**Masculino**	**Feminino**	OBS:

GRUPO DO PACIENTE					
Controle	**HTLV -1+ assintomático**	**HAM/TSP Definitivo**	**HAM/TSP Provável**	**HAM/TSP Possível**	Ano do diagnóstico

CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE (☐ Inclusão; ■ Exclusão)		
Testes laboratoriais de triagem e confirmatórios	**SIM**	**NÃO**
HTLV-1 positivo WB+ ou PCR+		
HTLV-2 positivo WB+ ou PCR+		
HIV positivo confirmado por WB ou PCR		
HBV positivo com HBsAg+		
HCV positivo com PCR+		
Chagas com ELISA+		
Sífilis com VDRL+		
TB ativa		

Anexo 1. Continuação.

B) FICHA DE DADOS CLÍNICO-LABORATORIAIS PARA HAM/TSP OU ASSINTOMÁTICO*

*(*Deverá ser preenchida apenas para os pacientes elegíveis para participação na pesquisa)*

CLASSIFICAÇÃO DO PACIENTE HAM/TSP		
HTLV -1+ assintomático	**HAM/TSP Definitivo**	**HAM/TSP Provável**

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE HAM/TSP
Nome/Registro HC: Cole a etiqueta aqui

EXAMES CLÍNICOS		
Sinais e sintomas primários relacionados à HAM/TSP	**SIM**	**NÃO**
Assintomático		
Paresia crônica progressiva		
Espasticidade		
Hiperreflexia		
Parestesias		
Síndrome piramidal (Babinski e/ou clônus)		
Lombalgia		
Mialgia		
Distúrbios urinários		
Disfunção erétil		
Constipação		
Manifestações clínicas possivelmente relacionadas à HAM/TSP	**SIM**	**NÃO**
Artropatia		

Uveíte		
Polimiosite / Miopatia		
Xerose cutânea		
Síndrome Sjögren / Síndrome de Sicca		
Estrongiloidíase		
Evolução da HAM/TSP	**SIM**	**NÃO**
Progressor lento (poucos sinais de dano no SNC) Primeiros sintomas: ____/____/_____		
Progressor rápido (evolução para mielopatia) Primeiros sintomas: ____/____/_____		
EXAMES DE IMAGENS Data:		
Ressonância Magnética de Coluna Torácica	**SIM**	**NÃO**
Compressão Extrínseca		
Atrofia Medular		
Hipersinal em T2		
TERAPIA Data:		
Qual? (Esquema utilizado, droga e duração)	**SIM**	**NÃO**
OBSERVAÇÕES		

Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido aplicado aos pacientes recrutados no presente estudo.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Pacientes)

1- Dados de identificação do sujeito ou responsável legal:
Nome do paciente:
RG n.º: **Sexo:** **Data nasc.:**
Endereço:
Bairro: **Cidade/UF:**
CEP: **Telefone:**

2 - Responsável legal:
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador):
RG. nº: **Sexo:** **Data de nasc.:**
Endereço: **Apto:**
Bairro: **Cidade:**
CEP: **Telefone:**

DADOS SOBRE A PESQUISA CLÍNICA
Título: "Estudo da expressão de microRNAs em indivíduos com infecção assintomática e com doenças associadas ao HTLV-1 [leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) e com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP)]"
Pesquisador responsável: Dr. Aluisio Augusto Cotrim Segurado
Cargo/Função: Diretor da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC - FMUSP
Inscrição no Conselho Regional n.º: CRM/SP 39767
Unidade do HC-FMUSP: Laboratório de Investigação Médica 52 (LIM-52)
Avaliação do risco da pesquisa - ***probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo:*** Risco mínimo
Duração da pesquisa: 3 anos

1) Desenho do Estudo e Objetivos
O objetivo deste estudo é avaliar um tipo de molécula que faz parte das células do seu corpo, chamadas de microRNAs. Todas as pessoas sadias e doentes têm essas moléculas no sangue, mas pessoas que têm a infecção pelo HTLV-1 (vírus que pode causar a doença neurológica HAM/TSP ou a leucemia ATL), podem ter essas moléculas desreguladas, a depender da sua condição clínica, ou seja, se você apresenta ou não sintomas relacionados a essa infecção.

A infecção pelo HTLV-1 pode alterar o sistema de defesa do indivíduo, e por isso, compreender como o vírus interage com o nosso sistema imunológico, é fundamental para melhorar ações no cuidado, acompanhamento e tratamento dessas pessoas. Para entender melhor se esses microRNAs ajudam a manter o indivíduo sem sintomas por algum tempo ou se estão associados ao desenvolvimento ou progressão da HAM/TSP ou ATL, realizaremos testes em laboratório com amostras de sangue de alguns voluntários.

- Você pode ser incluído no seguinte grupo de voluntários:

 Pessoas que têm teste positivo para HTLV-1

2. Procedimentos da pesquisa

Após ter sido esclarecido sobre o estudo, você poderá decidir se deseja ou não participar. Se decidir participar, você será solicitado a assinar esse **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** ou colocar suas impressões digitais em frente a uma testemunha de sua confiança. Uma cópia deste documento lhe será fornecida. Sua participação consistirá de uma visita ao ambulatório, onde será realizada uma consulta médica para obter dados clínicos, a serem analisados conjuntamente aos resultados dos testes laboratoriais, realizados em 80 mL de sangue (equivalente a um terço de um copo de requeijão) coletados por punção periférica de veia no antebraço (procedimento rotineiro).

3. Relação dos procedimentos

- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- Coleta de no mínimo 80 mL por acesso venoso periférico em antebraço de pacientes assintomáticos e com HAM/TSP

4. Riscos e desconfortos esperados

Os riscos relacionados com sua participação são mínimos. Algumas pessoas referem dor no local da punção venosa e sensação de desmaio, e raramente ocorrem complicações como formação de hematomas ou infecções locais.

5. Vantagens na participação deste estudo

Não existe nenhum benefício direto a você por participar neste estudo, mas as informações obtidas por sua participação poderão beneficiar no futuro outras pessoas, a depender das conclusões do estudo. Você não teve despesas pessoais incluindo exames e consultas. Despesas adicionais serão absorvidas pelo orçamento da pesquisa. Não haverá compensação financeira.

6. Procedimentos alternativos e/ou experimentais

Você não será submetido a nenhum procedimento experimental neste estudo. Como não se trata de estudo relacionado a possíveis tratamentos, não existem procedimentos alternativos a serem descritos.

7. Garantia de acesso aos pesquisadores

Você teve acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os pesquisadores envolvidos no estudo são o Dr. Aluísio Augusto Cotrim Segurado e Emanuela Avelar Silva Costa,

que podem ser encontrados na Rua Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, Instituto Central, CEP 05403-900 - São Paulo - SP – Brasil Telefone: +55 (11) 2661-7143. Caso ainda persistam dúvidas acerca da pesquisa, você poderá entrar em contato com a Profa. Maria Aparecida Shikanai Yasuda, responsável pela Comissão de Ética em Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo telefone (11) 3061-7048.

8. Voluntariedade
Você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9. Direito de Confidencialidade
A confidencialidade das informações obtidas neste estudo será garantida e os dados obtidos serão analisados em conjunto com os de outros voluntários, não sendo divulgada a sua identificação do voluntário. Sua participação neste estudo é confidencial e sigilosa. A menos que seja exigido por lei, somente a equipe de estudo, Comitês de Ética em Pesquisa e Investigadores das agências regulatórias governamentais poderão ter acesso direto aos prontuários médicos para verificar as informações do estudo. O material e dados coletados durante este projeto só serão utilizado para esta pesquisa.

10. Direito de ser mantido atualizado quanto aos resultados da pesquisa
Os dados obtidos com a realização deste estudo estarão à disposição dos voluntários sem que o sigilo de cada participante seja prejudicado.

11. Despesas e Compensações
Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal comprovadamente relacionado com a sua participação neste estudo, você teve direito a tratamento médico na Instituição.

12. Compromisso do pesquisador
Materiais e dados obtidos serão utilizados somente para estudo e publicações científicas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu discuti com o Dr. Aluisio Augusto Cotrim Segurado e/ou com Emanuela Avelar Silva Costa sobre minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros pra mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, riscos e as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos pertinentes. Ficou claro também que minha participação não trará despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____ _____

Assinatura do paciente/representante legal Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo,

_____ _____

Prof. Dr. Aluisio Augusto Cotrim Segurado Data
Pesquisador

_____ _____

Emanuela Avelar Silva Costa Data
Pesquisadora

Anexo 3. Termo de consentimento livre e esclarecido aplicado aos funcionários do HC-FMUSP recrutados no presente estudo como grupo controle.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(FUNCIONÁRIOS DO HC-FMUSP)

1- Dados de identificação do sujeito ou responsável legal:
Nome:
RG n.º: **Sexo:** **Data nasc.:**
Endereço:
Bairro: **Cidade:**
CEP: **Telefone:**

2 - Responsável legal:
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador):
RG. nº: **Sexo:** **Data de nasc.:**
Endereço: **Apto:**
Bairro: **Cidade:**
CEP: **Telefone:**

DADOS SOBRE A PESQUISA CLÍNICA
Título: "Estudo da expressão de microRNAs em indivíduos com infecção assintomática e com doenças associadas ao HTLV-1 [leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) e com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP)]"
Pesquisador responsável: Dr. Aluisio Augusto Cotrim Segurado
Cargo/Função: Diretor da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC - FMUSP
Inscrição no Conselho Regional n.º: CRM/SP 39767
Unidade do HC-FMUSP: Laboratório de Investigação Médica 52 (LIM-52)
Avaliação do risco da pesquisa - ***probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo:*** Risco mínimo
Duração da pesquisa: 3 anos

1) Desenho do Estudo e Objetivos
O objetivo deste estudo é avaliar um tipo de molécula que faz parte das células do seu corpo, chamadas de microRNAs. Todas as pessoas sadias e doentes têm essas moléculas no sangue, mas pessoas que têm a infecção pelo HTLV-1 (vírus que pode causar a doença neurológica HAM/TSP ou a leucemia ATL), podem ter essas moléculas desreguladas, a depender da sua condição clínica, ou seja, se você apresenta ou não sintomas relacionados a essa infecção.

A infecção pelo HTLV-1 pode alterar o sistema de defesa do indivíduo, e por isso, compreender como o vírus interage com o nosso sistema imunológico, é fundamental para melhorar ações no cuidado, acompanhamento e tratamento dessas pessoas. Para entender melhor se esses microRNAs ajudam a manter o indivíduo sem sintomas por algum tempo ou se estão associados ao desenvolvimento ou progressão da HAM/TSP ou ATL, realizaremos testes em laboratório com amostras de sangue de alguns voluntários.

- Você pode ser incluído no seguinte grupo de voluntários:

 Pessoas que têm teste negativo para HTLV-1/2, HIV, Hepatite B, Hepatite C, sífilis e doença de Chagas, sem problemas de saúde aparentes.

2. Procedimentos da pesquisa

Após ter sido esclarecido sobre o estudo, você poderá decidir se deseja ou não participar. Se decidir participar, você será solicitado a assinar esse **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** ou colocar suas impressões digitais em frente a uma testemunha de sua confiança. Uma cópia deste documento lhe será fornecida. Sua participação consistirá na doação de células chamadas leucócitos que ficam retidas em filtros durante a aférese, seu ato de doação de plaquetas à Fundação Hemocentro de São Paulo. Após a realização dos testes laboratoriais obrigatórios para a doação (procedimento rotineiro), você aceitará que os pesquisadores tenham acesso aos resultados dos seus exames sorológicos de triagem realizados na data da doação, os quais indicarão se você está apto ou não para a doação. Caso esteja, sua participação na pesquisa será confirmada.

3. Relação dos procedimentos

- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
- Coleta de no mínimo 80 mL por acesso venoso periférico em antebraço

4. Riscos e desconfortos esperados

Os riscos relacionados com sua participação são mínimos. Algumas pessoas referem dor no local da punção venosa e sensação de desmaio, e raramente ocorrem complicações como formação de hematomas (manchas roxas na pele) ou infecções locais.

5. Vantagens na participação deste estudo

Não existe nenhum benefício direto a você por participar neste estudo, mas as informações obtidas por sua participação poderão beneficiar no futuro outras pessoas, a depender das conclusões do estudo. Você não teve despesas pessoais incluindo exames e consultas. Despesas adicionais serão absorvidas pelo orçamento da pesquisa. Não haverá compensação financeira.

6. Procedimentos alternativos e/ou experimentais

Você não será submetido a nenhum procedimento experimental neste estudo. Como não se trata de estudo relacionado a possíveis tratamentos, não existem procedimentos alternativos a serem descritos.

7. Garantia de acesso aos pesquisadores
Você teve acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os pesquisadores envolvidos no estudo são o Dr. Aluísio Augusto Cotrim Segurado e Emanuela Avelar Silva Costa, que podem ser encontrados na Rua Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, Instituto Central, CEP 05403-900 - São Paulo - SP – Brasil Telefone: +55 (11) 2661-7143. Caso ainda persistam dúvidas acerca da pesquisa, você poderá entrar em contato com a Profa. Maria Aparecida Shikanai Yasuda, responsável pela Comissão de Ética em Pesquisa do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pelo telefone (11) 3061-7048.

8. Voluntariedade
Você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9. Direito de Confidencialidade
A confidencialidade das informações obtidas neste estudo será garantida e os dados obtidos serão analisados em conjunto com os de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação do voluntário. Sua participação neste estudo é confidencial e sigilosa. A menos que seja exigido por lei, somente a equipe de estudo, Comitês de Ética em Pesquisa e Investigadores das agências regulatórias governamentais poderão ter acesso direto aos prontuários médicos para verificar as informações do estudo. O material biológico e dados coletados não serão armazenados para pesquisas futuras, nem serão utilizados para outros fins, além do proposto no presente estudo.

10. Direito de ser mantido atualizado quanto aos resultados da pesquisa
Os dados obtidos com a realização deste estudo estarão à disposição dos voluntários sem que o sigilo de cada participante seja prejudicado.

11. Despesas e Compensações
Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal comprovadamente relacionado com a sua participação neste estudo, você teve direito a tratamento médico na Instituição.

12. Compromisso do pesquisador
Materiais e dados obtidos serão utilizados somente para estudo e publicações científicas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu discuti com o Dr. Aluisio Augusto Cotrim Segurado e/ou com Emanuela Avelar Silva Costa sobre minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros pra mim quais são os objetivos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, riscos e as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos pertinentes. Ficou claro também que minha participação não trará despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar, quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____ _____

Assinatura do paciente/representante legal Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo,

_____ _____

Prof. Dr. Aluisio Augusto Cotrim Segurado Data
Pesquisador

_____ _____

Emanuela Avelar Silva Costa Data
Pesquisadora

Anexo 4. Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP do projeto de número *on-line* 855/08.

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

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 05/11/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0855/08**, intitulado: "**ANÁLISE FUNCIONAL DE LINFÓCITOS T CD4+ DE PACIENTES CO-INFECTADOS PELO HIV-1 E HTLV-I**" apresentado pelo Departamento de **MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Ésper Georges Kallás**
Pesquisador (a) Executante: **Fabio Eudes Leal**

CAPPesq, 05 de Novembro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Anexo 5. Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP do projeto de número *on-line* 12144/14.

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROJETO DE PESQUISA

Título: ESTUDO DA EXPRESSÃO DE MICRORNAS EM INDIVÍDUOS COM INFECÇÃO ASSINTOMÁTICA E COM DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1 [LEUCEMIA/LINFOMA DE CÉLULAS T DO ADULTO (ATL) E PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL/MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-1 (TSP/HAM)]
Pesquisador Responsável: Aluísio Augusto Cotrim Segurado **Versão:**
Pesquisador Executante: Emanuela Avelar Silva Costa **CAAE:** 33359614.0.0000.0068
Co-autores: Edécio Cunha-Neto, Ester C. Sabino, Juliana Pereira, Karina I.L.C. Salmazi, Ludmila R.P. Ferreira, Ésper G. Kallás
Finalidade Acadêmica: Doutorado
Orientador: Aluisio A. Cotrim Segurado
Instituição: HCFMUSP
Departamento: MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Registro on-line: 12144

Número do Parecer: 722.557

Data da Relatoria: 18/07/2014-***ad-referendum***

Apresentação do Projeto: Considerando os diferentes aspectos evolutivos da infecção pelo HTLV-1, os autores destacam que os fatores associados à infecção assintomática ou ao desenvolvimento de doença não estão totalmente elucidados. Referem que, além da carga proviral de HTLV-1 e de outros fatores melhor avaliados, microRNAs desregulados em células do hospedeiro transformadas pelo HTLV-1 poderiam promover alterações nos padrões de expressão de genes virais e celulares, com possível contribuição para o desenvolvimento de paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (TSP/HAM) e leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL). Consideram ainda que, se identificarem padrões de expressão de miRNAs em pacientes assintomáticos e doentes, caso estes padrões venham a ser associados ao desenvolvimento das doenças TSP/HAM e ATL, posteriormente, em estudos longitudinais, os padrões de expressão de miRNAs poderão se testados como candidatos a marcadores moleculares de progressão para TSP/HAM e/ou ATL. Além disto, como na maioria dos estudos publicados utilizou-se para detecção de miRNAs o método qPCR, resultando em avaliação do perfil de expressão restrita a miRNAs pontuais , os autores se propõem a utilizar método mais sensível, específico e abrangente,no sentido de ampliar o número de miRNAs a serem pesquisados. Para isto, irão utilizar a plataforma TaqMan® Low Density Array (TLDA) MicroRNA, que vem emergindo no mercado, permitindo detectar e quantificar a expressão de centenas de miRNAs em uma única amostra. O trabalho será realizado com delineamento de um estudo transversal. A casuística a ser estudada será de 80 indivíduos, divididos nos seguintes Grupos: Portadores de HTLV-1 assintomáticos - 25 casos Pacientes com TSP/HAM - 15 casos Pacientes com ATL - 20 casos Doadores de plaquetas - Grupo Controle - 20 casos Em cada um dos pacientes será colhida apenas uma amostra de sangue e as amostras do Grupo controle serão obtidas no Banco de Sangue do HCFMUSP. Os prontuários serão utilizados como fontes secundárias de dados. Não haverá retenção de amostras de sangue para armazenamento em Banco. A Pesquisa terá o apoio financeiro do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Duração da pesquisa: 3 anos

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Anexo 5. Continuação

Hospital das Clínicas da FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Objetivo da Pesquisa: 1) quantificar a expressão de miRNAs humanos em células CD4+ e CD8+ do sangue periférico de indivíduos HTLV-1 positivos assintomáticos, de pacientes com TSP/HAM e com ATL; 2) identificar padrões de expressão de miRNAs desregulados que possam caracterizar os grupos de pacientes de acordo com suas condições clínicas; 3) estabelecer associações de possíveis padrões de expressão de miRNAs identificadas com: a expressão dos genes tax e HBZ do HTLV-1, com o padrão de citocinas antivirais e proinflamatórias, com o perfil imunofenotípico de linfócitos periféricos, e ainda, com a carga proviral de HTLV-1 detectada em sangue periférico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Riscos: mínimos. Benefícios: nenhum benefício direto aos voluntários

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A linha de Pesquisa é interessante e promissora e poderá contribuir para a identificação de biomarcadores prognósticos em pacientes HTLV-1 positivos. O trabalho poderá ser viabilizado com os recursos da Instituição e o apoio financeiro já obtido. Como há infraestrutura para a realização da pesquisa acredita-se que, caso o tamanho da amostra não venha a ser suficiente, será possível a ampliação da mesma através do serviço assistencial de rotina aos indivíduos HTLV-1 positivos

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória: Adequado e de fácil compreensão

Recomendações: Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: Aprovar

Situação do Parecer: APROVADO

Necessita Apreciação da CONEP: Não

Considerações Finais a critério do CEP: Em conformidade com a Resolução 466/12 – cabe ao pesquisador: **a)** desenvolver o projeto conforme delineado; **b)** elaborar e apresentar relatórios parciais e final; **c)**apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; **d)** manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; **e)** encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; **f)** justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

São Paulo, 18 de Julho de 2014

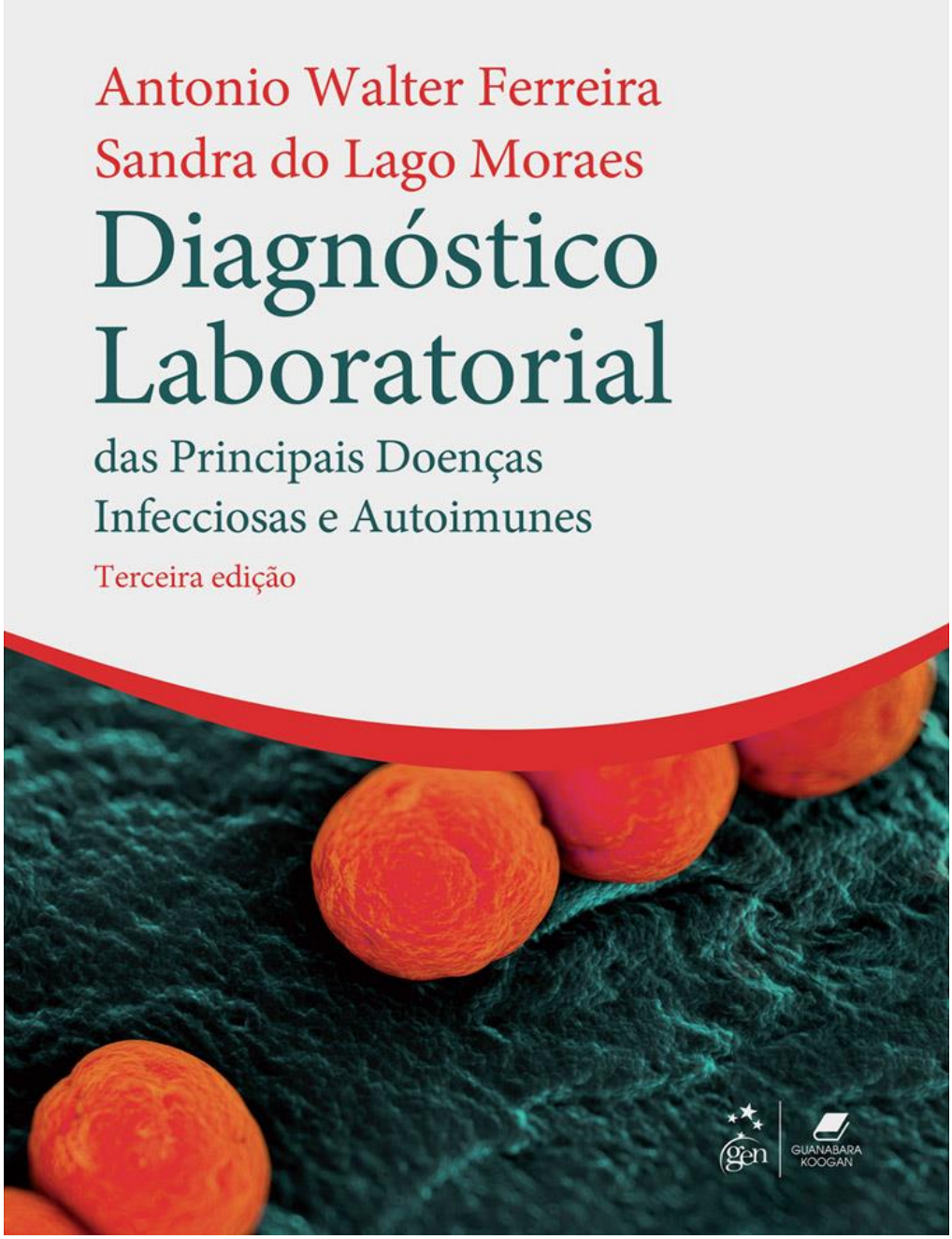
Prof. Dr. Joel Faintuch
Vice-Coordenador
Comissão de Ética Para Análise de Projetos de Pesquisa

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar
CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
55 11 2661-7585 - 55 11 2661-6442 ramais: 16, 17, 18 | marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Anexo 6. Produção científica.

Anexo 6.1. Capítulo de livro

COSTA JMP; **COSTA EAS**; SEGURADO AAC. Infecção por HTLV-I e HTLV-II. In: Antônio Walter Ferreira & Sandra do Lago Moraes. (Org.). Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes. 3ed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, p. 120-134.



Anexo 6.3. Continuação

Colaboradores

Adelaide José Vaz, MSc, PhD (*in memoriam*)
Professora Associada do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP.

Alda Maria da Cruz, MD, PhD
Professora Associada da disciplina Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ. Pesquisadora Titular em Saúde Pública do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

Alexandre Meneghello Fuentefria, Sc, PhD
Professor Adjunto Doutor do Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRG.

Aluísio Augusto Cotrim Segurado, MD, PhD
Professor Titular do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP.

Ana Karolina Barreto de Oliveira, MD, MSc
Médica colaboradora do Ambulatório de Imunodeficiências Primárias do Serviço de Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas – FMUSP.

Ana Marisa Fusco Almeida, MSc, PhD
Professora Assistente Doutora da disciplina Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp (Araraquara). Docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia.

Angela Maria Egydio de C. Barreto, MSc
Chefe do Departamento de Diagnóstico da Sorologia da Fundação Pró-Sangue – Hemocentro de São Paulo.

Benedito Anselmo Peres, PhD
Professor Assistente Doutor do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP.

Cláudio Sérgio Pannuti, MD, PhD
Professor Associado do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP. Docente pesquisador do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, da Universidade de São Paulo.

Cristina Maria Kokron, MD, PhD
Professora Assistente Doutora e Colaboradora Médica da disciplina Imunologia Clínica e Alergia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP. Vice-Coordenadora do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia (LIM-60) – FMUSP.

Cristina Miuki Abe Jacob, MD, PhD
Professora Associada do Departamento de Pediatria e Chefe da Unidade de Alergia e Imunologia do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

Cristóvão Luis Pitangueira Mangueira, MD, PhD, MBA
Gerente Médico do Departamento de Patologia Clínica e Anatomia Patológica do Hospital Israelita Albert Einstein. Médico da seção de Imunologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

Edite Hatsumi Y. Kanashiro, MSc
Pesquisadora do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Edna Maria Vissoci Reiche, MSc
Professora Associada do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina. Responsável pelos setores de Imunologia Clínica e Diagnóstico Molecular do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina.

Edward Oliveira, MSc, PhD
Pesquisador Nível II do CNPq e Pesquisador Adjunto no Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz.

Eide Dias Camargo
Pesquisadora Científica, Divisão de Biologia Médica, Seção de Sorologia, Área de Imunodiagnóstico do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde.

Emanuela Avelar Silva Costa, MSc
Doutoranda em Ciências do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

Ester Cerdeira Sabino, MD, PhD
Professor Livre-Docente do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

Gerusa Dreyer, MD, PhD
Professora Adjunta aposentada de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE e Pesquisadora Titular aposentada do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz. Consultora Científica da ONG Amaury Coutinho para Doenças Tropicais.

Guita Elefant, MSc, PhD
Pesquisadora Científica do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – USP.

Ivani Lúcia Leme, MSc, PhD
Pesquisadora Científica da disciplina Infectologia do Departamento de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP e membro da Comissão de Epidemiologia Hospitalar – Controle Ambiental do Hospital São Paulo.

Jerolino Lopes Aquino
Professor Titular aposentado de Parasitologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal de Mato Grosso – UFMT. Chefe do setor de Parasitologia do Laboratório Carlos Chagas em Cuiabá (MT).

João Renato Rebello Pinho, MD, PhD
Médico do Departamento de Patologia Clínica do Hospital Israelita Albert Einstein e do Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP.

José Antônio Livramento, MD, PhD
Professor Livre-Docente do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP. Sócio do Laboratório de Neurodiagnóstico Spina França.

José Eduardo Levi, MSc, PhD
Pesquisador do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – USP. Chefe do Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Pró-Sangue/Hemocentro de São Paulo. Consultor de Pesquisas do Banco de Sangue do Hospital Albert Einstein (SP).

José Figueirêdo-Silva, PhD
Ex-Professor Titular do Departamento de Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Professor adjunto de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual do Piauí – UESPI.

José Marcos Pereira Costa, MD, MSc
Médico Infectologista e Patologista Clínico do Hospital Heliópolis do Estado de São Paulo.

José Pascoal Simonetti, MSc
Pesquisador Titular da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Consultor Técnico e Científico em Biologia Molecular, Virologia, Imunovirologia, Biossegurança e Bioproteção. Assessor Técnico e Científico para a Superintendência de Vigilância em Saúde/CGLab/MS e para a Coordenação Geral de Assuntos Regulatórios, Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos/MS.

Kelly Aparecida Kanunfre, MSc, PhD
Pesquisadora Científica do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – USP.

Kioko Takei, MSc, PhD
Professora Doutora aposentada do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – USP e responsável pela Unidade de Imunologia do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo.

Lilian Ferri Passadore, MSc
Farmacêutica do setor de Biologia Molecular do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo – USP.

Luciana de Almeida Silva Teixeira, MD, MSc, PhD
Professora Adjunta da disciplina Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM.

Luís dos Ramos Machado, MD, PhD
Professor Assistente Doutor em Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Membro e ex-chefe do Grupo de Doenças Infecciosas do Sistema Nervoso do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP. Editor da revista *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*.

Maira Pedreschi, MSc
Doutoranda em Ciências pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP. Colaboradora do Laboratório de Imunologia Clínica e Alergia (LIM - 60) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Márcia de Souza Carvalho Melhem, MSc, PhD
Pesquisadora Científica nível VI do Instituto Adolfo Lutz, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde.

Marcos Vinícius da Silva, MD, MSc, PhD
Professor Associado do Departamento de Medicina da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade de Campinas (SP), disciplina Doenças Infecciosas e Parasitárias. Professor do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Diretor da Divisão Científica do Instituto de Infectologia Emílio Ribas da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo.

Maria Carmen Arroyo Sanchez, MSc, PhD
Pesquisadora Científica do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo – USP.

Maria José S. Mendes-Giannini, MSc, PhD
Professora Titular do Departamento de Análises Clínicas, disciplina Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Pró-Reitora de Pesquisa da UNESP e membro do Conselho Superior da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo – FAPESP.

REFERÊNCIAS

Aliya N, Rahman S, Khan ZK, Jain P. Cotranscriptional chromatin remodeling by small RNA species: an HTLV-1 perspective. *Leuk Res Treatment*. 2012 Feb;2012:984754.

Andrade RG, Gonçalves P de C, Ribeiro MA, Romanelli LC, Ribas JG, Torres EB, et al. Strong correlation between tax and HBZ mRNA expression in HAM/TSP patients: distinct markers for the neurologic disease. *J Clin Virol*. 2013 Nov;56(2):135-40.

Araujo AQ, Silva MT. The HTLV-1 neurological complex. *Lancet Neurol*. 2006 Dec;5(12):1068-76.

Asquith B, Bangham CR. How does HTLV-I persist despite a strong cell-mediated immune response? *Trends Immunol*. 2008 Nov;29(1):4-11.

Azimi N, Brown K, Bamford RN, Tagaya Y, Siebenlist U, Waldmann TA. Human T cell lymphotropic virus type I Tax protein trans-activates interleukin 15 gene transcription through an NF-kappaB site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 3;95(5):2452-7.

Azran-Shaish I, Tabakin-Fix Y, Huleihel M, Bakhanashvili M, Aboud M. HTLV-1 tax-induced NF-kappaB activation is synergistically enhanced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate: mechanism and implications for Tax oncogenicity. *J Mol Med (Berl)*. 2008 Jul;86(7):799-814.

Bartoe JT, Albrecht B, Collins ND, Robek MD, Ratner L, Green PL, et al. Functional role of pX open reading frame II of human T-lymphotropic virus type 1 in maintenance of viral loads in vivo. *J Virol*. 2000 Feb;74(3):1094-100.

Bellon M, Lepelletier Y, Hermine O, Nicot C. Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood*. 2009 Feb;113(20):4914-7.

Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and owerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc*. 1995;289-300.

Bezerra-Neto JE. Análise do perfil de expressão de microRNAs em tumores adrenocorticais benignos e malignos humanos / João Evangelista Bezerra Neto. São Paulo. [Tese] Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2014. 134p.

Bentwich I. Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett.* 2005 Sep;579(26):5904-10.

Bouzar AB, Willems L. How HTLV-1 may subvert miRNAs for persistence and transformation. *Retrovirology*. 2008 Nov;5:101.

Boxus M, Twizere JC, Legros S, Dewulf JF, Kettmann R, Willems L. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology.* 2008 Aug;5:76.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria em Vigilância da Saúde. Programa Nacional de DST/AIDS. Guia de manejo clínico de HTLV. Brasília, 2003.

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature rev*. 2006;6:857-66.

Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest*. 2009 Aug;119(9):2772-86.

Castro-Lima H, Galvão-Castro B. Ocular lesions in HTLV-1 infected patients from Salvador, State of Bahia: the city with the highest prevalence of this infection in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009 Nov-Dez;42(6):633-7.

Cross SL, Feinberg MB, Wolf JB, Holbrook NJ, Wong-Staal F, Leonard WJ. Regulation of the human interleukin-2 receptor alpha chain promoter: activation of a nonfunctional promoter by the transactivator gene of HTLV-I. *Cell*. 1987 Apr10;49(1):47-56.

D'Agostino DM, Zanovello P, Watanabe T, Ciminale V. The microRNA regulatory network in normal- and HTLV-1-transformed T cells. *Adv Cancer Res*. 2012;113:45-83.

Castro-Costa CM, Araújo AQ, Barreto MM, Takayanagui OM, Sohler MP, da Silva EL et al. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). AIDS Res Hum Retroviruses. 2006 Oct;22(10):931-5.

de Oliveira MF, Brites C, Ferraz N, Magalhães P, Almeida F, Bittencourt AL. Infective dermatitis associated with the human T-cell lymphotropic virus type I HTLV-I in Salvador, Bahia, Brazil. *Clin Infect Dis*. 2005;40:90-6.

Durkin K, Rosewick N, Artesi M, Hahaut V, Griebel P, Arsic N, Burny A, Georges M, Van den Broeke A. Characterization of novel Bovine Leukemia Virus (BLV) antisense transcripts by deep sequencing reveals constitutive expression in tumors and transcriptional interaction with viral microRNAs. *Retrovirology*. 2016 May 3;13(1):33.

Desdouits M, Cassar O, Maisonobe T, Desrames A, Aouba A, Hermine O, et al. HTLV-1-associated inflammatory myopathies: low proviral load and moderate inflammation in 13 patients from West Indies and West Africa. *J Clin Virol*. 2013 Jan;57(1):70-6.

Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*. 2004 Mar;18(5):504-11.

Eisfeld AK, Marcucci G, Maharry K, Schwind S, Radmacher MD, Nicolet D, et al. miR-3151 interplays with its host gene BAALC and independently affects

outcome of patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012 Jul;120(2):249-58.

Enright AJ, John U, Gaul U, Tuschl T, Sander S, Marks DS. MicroRNA targets in Drosophila sp. *Genome Biol*, 2003 5:R1.

Ferreira LR, Frade AF, Santos RH, Teixeira PC, Baron MA, Navarro IC, et al. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a and miR-208b are dysregulated in Chronic Chagas disease Cardiomyopathy. *Int J Cardiol*. 2014. pii: S0167-5273(14)01002-X. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.05.019.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb;391(6669):806-11.

Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood*. 1995 Nov;86:3619-39.

Furtado Mdos S, Andrade RG, Romanelli LC, Ribeiro MA, Ribas JG, Torres EB, Barbosa-Stancioli EF, Proietti AB, Martins ML. Monitoring the HTLV-1 proviral load in the peripheral blood of asymptomatic carriers and patients with HTLV-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from a Brazilian cohort: ROC curve analysis to establish the threshold for risk disease. *J Med Virol*. 2012 Apr;84(4):664-71.

Gadelha SR. Correlação de polimorfismos na região promotora dos genes de IL-6 e IL-10 com o desenvolvimento de doenças em indivíduos infectados pelo HTLV-I e análise da distribuição destes polimorfismos em diferentes grupos populacionais brasileiros. Salvador: Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. [Tese] 2007. 97 p.

Gaudray G, Gachon F, Basbous J, Biard-Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard JM. The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J Virol*. 2002 Dec;76:12813-22.

Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol*. 2012 Nov;3:388.

Ghisi M, Corradin A, Basso K, Frasson C, Serafin V, Mukherjee S, et al. Modulation of microRNA expression in human T-cell development: targeting of NOTCH3 by miR-150. *Blood*. 2011 Jun;117(26):7053-62.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996;6(10):995-1001.

Goon PK, Igakura T, Hanon E, Mosley AJ, Asquith B, Gould KG et al. High circulating frequencies of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD4+ T cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *J Virol*. 2003 Sep;77(17):9716-22.

Grant C, Barmak K, Alefantis T, Yao J, Jacobson S, Wigdahl B. 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*. 2002 Feb;190(2):133-59.

Griffiths-Jones S, Hui JH, Marco A, Ronshaugen M. MicroRNA evolution by arm switching. *EMBO Rep*. 2011 Feb;12(2):172-7.

Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ. Posttranscriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet.* 2001; 2:110-9.

Hall WW, Kubo T, Lijichi S, Takahashi H, Zhu SW. Human T cell leukemia/lymphoma virus, type II (HTLV-II): emergence of an important newly recognized pathogen. *Sem Virol*. 1994; 5:165-78.

Hall WW, Fujii M. Deregulation of cell-signaling pathways in HTLV-1 infection. *Oncogene*. 2005 Apr;24(39):5965-75.

Houzet L, Jeang KT. MicroRNAs and human retroviruses. Biochim Biophys Acta. 2011 Nov-Dec;1809(11-12):686-93.

Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, et al. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med*. 2007 Oct;13(10):1241-7.

Jeffery KJ1, Usuku K, Hall SE, Matsumoto W, Taylor GP, Procter J et al. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 30;96(7):3848-53.

Jones KB, Salah Z, Del Mare S, Galasso M, Gaudio E, Nuovo GJ, et al. miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. *Cancer Res*. 2012 APR;72(7):1865-77.

Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2006; 57:19-53.

Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005 Sep;309(5740):1577-81.

Jr Ode F, Moore CS, Kennedy TE, Antel JP, Bar-Or A, Dhaunchak AS. MicroRNA dysregulation in multiple sclerosis. *Front Genet*. 2012 Jan;3:311.

Kamihira S, Dateki N, Sugahara K, Hayashi T, Harasawa H, Minami S, Hirakata Y, Yamada Y. Significance of HTLV-1 proviral load quantification by real-time PCR as a surrogate marker for HTLV-1-infectedcell count. *Clin Lab Haematol*. 2003 Apr;25(2):111-7.

Kannagi M, Harada S, Maruyama I, Inoko H, Igarashi H et al. Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) *pX* gene products by human CD8+ cytotoxic T cells directed against HTLV-Iinfected cells. *Int Immunol*. 1991 Aug;3:761-7.

Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*. 2007 Oct;39(10):1278-84.

Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira J, Iwamasa T, Goto I, Yamamoto N. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*. 1993 Sep;196(1):25-33.

Leal FE. Alterações de subpopulações de células T CD4+ em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2012. 87p.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 1993 Dec;75(5):843-54.

Levin MC, Lee SM, Kalume F, Morcos Y, Dohan FC, Jr, Hasty KA, et al. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nat Med*. 2002 May;8(5):509-13.

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003 Dec;115(7):787-98.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

Manns A, Miley WJ, Wilks RJ, Morgan OS, Hanchard B, Wharfe G et al. Quantitative proviral DNA and antibody levels in the natural history of HTLV-I infection. *J Infect Dis*. 1999 Nov;180(5):1487-93.

Mar-Aguilar F, Mendoza-Ramírez JA, Malagón-Santiago I, Espino-Silva PK, Santuario-Facio SK, Ruiz-Flores P, Rodríguez-Padilla C, Reséndez-Pérez D. Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers. *Dis Markers*. 2013;34(3):163-9.

Matsuoka M, Green PL. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology*. 2009 Aug; 6:71.

Mazière P, Enright AJ. Prediction of microRNA targets. *Drug Discov Today*. 2007 Jun;12(11-12):452-8.

Meng F, Hackenberg M, Li Z, Yan J, Chen T. Discovery of novel microRNAs in rat kidney using next generation sequencing and microarray validation. *PLoS One*. 2012; 7(3):e34394.

Mesnard JM, Barbeau B, Devaux C. HBZ, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia. *Blood*. 2006 Dec;108(13):3979-3982.

miRBase 21. The miRBase Sequence Database - Release 21 [acesso em 10 jul. 2016]. Disponível em: http://www.mirbase.org/cgi-bin/query.pl?terms=homo+sapiens

Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, Nagata K, Hinuma Y. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature*. 1981 Dec 24;294(5843):770-1.

Moles R, Nicot C. The emerging role of miRNAs in HTLV Infection and ATLL Pathogenesis. *Viruses*. 2015 Jul;7(7):4047-74.

Nair VD, Ge Y. Alterations of miRNAs reveal a dysregulated molecular regulatory network in Parkinson's disease striatum. *Neurosci Lett*. 2016 Jun;629:99-104.

Navarro IC. Perfil de expressão de microRNAs no miocárdio na infecção aguda pelo Trypanosoma cruzi em camundongos / Isabela Cunha Navarro. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. [Dissertação] 2014. 107p.

Nicolete LD, Nicolete R, Haddad R, Azevedo R, Castro FA, Tanaka Y, Takayanagui OM, et al. Upregulation of hsa-miR-125b in HTLV-1 asymptomatic carriers and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Sep;107(6):824-7.

Nicot C, Harrod RL, Ciminale V, Franchini G. Human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 nonstructural genes and their functions. *Oncogene.* 2005 Sep;24(39):6026-34.

Nose H, Kubota R, Seth NP, Goon PK, Tanaka Y, Izumo S et al. Ex vivo analysis of human T lymphotropic virus type 1-specific CD4+ cells by use of a major histocompatibility complex class II tetramer composed of a neurological disease-susceptibility allele and its immunodominant peptide. *J Infect Dis*. 2007 Dec 15;196(12):1761-72.

Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol*. 2010 Mar;222(3):540-545.

Osame M, Matsumoto M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, et al. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T lymphotropic virus type I and adult T cell leukemia like cells. *Ann Neurol*. 1987 Feb;21:117-22.

Osame. Review of WHO Kagoshima Meeting and diagnostic guidelines for HAM/TSP. In: Blattner W, editor. Human Retrovirology: HTLV. New York: Raven Press; 1990. p. 191-7.

Otaguiri KK. Estudo funcional de microRNAs na infecção pelo HTLV-1. [Dissertação] Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. 2013. 122p.

Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grasser FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M, Russo JJ, Ju J, Randall G, Lindenbach BD, Rice CM, Simon V, Ho DD, Zavolan M, Tuschl T: Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*. 2005 Apr, 2(4):269-276.

Pichler K, Schneider G, Grassmann R. MicroRNA miR-146a and further oncogenesis-related cellular microRNAs are dysregulated in HTLV-1-transformed T lymphocytes. *Retrovirology*. 2008 Nov; 5:100.

Pilotti E, Bianchi MV, De Maria A, Bozzano F, Romanelli MG, Bertazzoni U, Casoli C. HTLV-1/-2 and HIV-1 co-infections: retroviral interference on host immune status. *Front Microbiol*. 2013 Dec 23;4:372.

Pinto MT. Perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4+ na infecção pelo HTLV-1. [Dissertação] Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 2011. 125p.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980 Dec; 77:7415-9.

Proietti, A. B. de F. C. HTLV Cadernos Hemominas. Minas Gerais: Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais; v. 15, n. 6, 2015.

Rahman S, Quann K, Pandya D, Singh S, Khan ZK, Jain P. HTLV-1 Tax mediated downregulation of miRNAs associated with chromatin remodeling factors in T cells with stably integrated viral promoter. *PLoS One*. 2012 Apr; 7(4):e34490.

Rathsam-Pinheiro RH, Boa-Sorte N, Castro-Lima-Vargens C, Pinheiro CA, Castro-Lima H, Galvão-Castro B. Ocular lesions in HTLV-1 infected patients from Salvador, State of Bahia: the city with the highest prevalence of this infection in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009 Nov-Dec;42(6):633-7.

Ruggero K, Guffanti A, Corradin A, Sharma VK, De Bellis G, Corti G et al. Small Noncoding RNAs in Cells Transformed by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1: a Role for a tRNA Fragment as a Primer for Reverse Transcriptase. *J Virol*. 2014 Apr;88(7):3612-22.

Saito M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J, Saito K, Arimura K et al. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated

myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology.* 2009 Feb;6:19.

Sampey GC, Van Duyne R, Currer R, Das R, Narayanan A, Kashanchi F. Complex role of microRNAs in HTLV-1 infections. *Front Genet*. 2012 Dec;3:295.

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

Satou Y, Matsuoka M. Molecular and Cellular Mechanism of Leukemogenesis of ATL: Emergent Evidence of a Significant Role for HBZ in HTLV-1-Induced Pathogenesis. *Leuk Res Treatment*. 2012 Nov;2012:213653.

Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983 Jun;80(12):3618-3622.

Shalaby SM, El-Shal AS, Shoukry A, Khedr MH, Abdelraheim N. Serum miRNA-499 and miRNA-210: A potential role in early diagnosis of acute coronary syndrome. *IUBMB Life*. 2016 Aug;68(8):673-82.

Shimotohno K, Takahashi Y, Shimizu N, Gojobori T, Golde DW, Chen IS, et al. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985 May;82(10):3101-5.

Shunaeva A, Potashnikova D, Pichugin A, Mishina A, Filatov A, Nikolaitchik O, Hu WS, Mazurov D. Improvement of HIV-1 and Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 Replication-Dependent Vectors via Optimization of Reporter Gene Reconstitution and Modification with Intronic Short Hairpin RNA. *J Virol*. 2015 Oct;89(20):10591-601.

Smith SM, Murray DW. An overview of microRNA methods: expression profiling and target identification. *Methods Mol Biol*. 2012; 823:119-38.

Starling AL, Martins-Filho OA, Lambertucci JR, Labanca L, de Souza Pereira SR, Teixeira-Carvalho A, et al. Proviral load and the balance of serum cytocines in HTLV-1-asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Acta Trop*. 2013 Jan;125(1):75-81.

Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3:Article3.

Sui W, Dai Y, Huang Y, Lan H, Yan Q, Huang H. Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation. *Transpl Immunol*. 2008 Apr;19(1):81-5.

Sun SC, Ballard DW. Persistent activation of NF-kappaB by the tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular IkappaB kinases. *Oncogene*. 1999 Nov 22;18(49):6948-58.

Tabakin-Fix Y, Azran I, Schavinky-Khrapunsky Y, Levy O, Aboud M. Functional inactivation of p53 by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein: mechanisms and clinical implications. *Carcinogenesis*. 2006 Apr;27(4):673-81.

Tomita M, Tanaka Y, Mori N. MicroRNA miR-146a is induced by HTLV-1 tax and increases the growth of HTLV-1-infected T-cells. *Int J Cancer*. 2012 May;130(10):2300-9.

Tong AW, Fulgham P, Jay C, Chen P, Khalil I, Liu S, et al. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Ther*. 2009 Mar; 16(3):206-16.

Tsukasaki K, Hermine O, Bazarbachi A, Ratner L, Ramos JC, Harrington W Jr, et al. Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-

cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *J Clin Oncol*. 2009 Jan;27(3):453-9.

Tufekci KU, Oner MG, Genc S, Genc K. MicroRNAs and Multiple Sclerosis. *Autoimmune Dis*. 2010 Nov;2011:807426.

Umbach JL, Cullen BR. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes Dev*. 2009; 23(10):1151-64.

Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell*. 2009 May;136(4):586-91.

Vine AM, Heaps AG, Kaftantzi L, Mosley A, Asquith B et al. The role of CTLs in persistent viral infection: cytolytic gene expression in CD8+ lymphocytes distinguishes between individuals with a high or low proviral load of human T cell lymphotropic virus type 1. *J Immunol*. 2004 Oct;173:5121-9.

Wang B, Howel P, Bruheim S, Ju J, Owen LB, Fodstad O, Xi Y. Systematic evaluation of three microRNA profiling platforms: microarray, beads array, and quantitative real-time PCR array. *PLoS One*. 2011 Feb;6(2):e17167.

Wang W, Zhao LJ, Tan YX, Ren H, Qi ZT. Identification of deregulated miRNAs and their targets in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2012 Oct;18(38):5442-53.

Wang F1, Ren S1, Chen R1, Lu J1, Shi X1, Zhu Y et al. Development and prospective multicenter evaluation of the long noncoding RNA MALAT-1 as a diagnostic urinary biomarker for prostate cancer. *Oncotarget*. 2014 Nov 30;5(22):11091-102.

Yamagishi M, Nakano K, Miyake A, Yamochi T, Kagami Y, Tsutsumi A, et al. Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF-κb pathway in adult T cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell*. 2012 Jan;21(1):121-35.

Yamano Y, Nagai M, Brennan M, Mora CA, Soldan SS, Tomaru U et al. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood*. 2002 Jan;99:88-94.

Yasunaga J, Matsuoka M. Molecular mechanisms of HTLV-1 infection and pathogenesis. *Int J Hematol*. 2011 Nov;94(5):435-42.

Yeung ML, Yasunaga J, Bennasser Y, Dusetti N, Harris D, Ahmad N, Matsuoka M, Jeang KT. Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotrophic virus 1. *Cancer Res*. 2008 Nov;68(21):8976-85.

Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1982 Mar;79:2031-5.

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

Yu J, Wang F, Yang GH, Wang FL, Ma YN, Du ZW, Zhang JW. Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Oct;349(1):59-68.

Zamore PD, Haley B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science*. 2005 Sep;309(5740):1519-24.

Zeng LL, He XS, Liu JR, Zheng CB, Wang YT, Yang GY. Lentivirus-Mediated Overexpression of MicroRNA-210 Improves Long-Term Outcomes after Focal Cerebral Ischemia in Mice. *CNS Neurosci Ther*. 2016 Jul:8.

Zhi H, Yang L, Kuo YL, Ho YK, Shih HM, Giam CZ. NF-κB hyper-activation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS Pathog*. 2011 Apr;7(4):e1002025.