MARI CLEIA MARTINS RODRIGUES FERREIRA

Estudo da expressão do gene hSecurina e quantificação do índice de DNA em portadores assintomáticos do vírus linfotrópico T humano tipo 1 e pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Pereira

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**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

Ferreira, Mari Cleia Martins Rodrigues

Estudo da expressão do gene hSecurina e quantificação do índice de DNA em portadores assintomáticos do vírus linfotrópico T humano tipo 1 e pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto / Mari Cleia Martins Rodrigues Ferreira. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.
Orientadora: Juliana Pereira.

Descritores: 1.Vírus 1 linfotrópico T humano 2.Leucemia-linfoma de células T do adulto 3.Ciclo celular 4.Aneuploidia 5.Securina 6.Citometria de fluxo

USP/FM/DBD-321/16

*À minha querida família,
na figura de meus pais **Maurílio e Dirce**,
de meu esposo **Luis Carlos** e
de meu filho **Luis Felipe***

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. **Dr^a. Juliana Pereira**, obrigada pela paciência, pela oportunidade acadêmica que me proporcionou explorar as fronteiras do conhecimento e superar minhas limitações, cujo exemplo como pessoa e profissional não ficarão limitados à orientação deste trabalho.

Ao Prof. **Dr. Sergio Paulo Bydlowski**, pelo apoio e pela oportunidade no meu aprendizado em biologia molecular.

À Prof^a. **Dr^a. Gracia Martinez**, pela qual tenho enorme carinho e admiração, agradeço pela confiança e pelo incentivo.

Ao **Dr. Cesar de Almeida Neto**, pelo apoio e pela atenção, principalmente nos momentos de espera dos doadores de aférese para coleta na Fundação pró-sangue Hemocentro de São Paulo.

À **Dra. Youko Nukui**, pela oportunidade de coleta no Ambulatório de HTLV-1 da Universidade de São Paulo.

Quero expressar meus sinceros agradecimentos e eterna gratidão à **Graciela Brocardo**, por sua grande amizade, e pelo incentivo para o início deste trabalho, cuja sabedoria e cujos conhecimentos em citometria de fluxo permitiram meu crescimento científico.

À **Carla Godoy**, pela sua amizade e ajuda, principalmente nos momentos mais difíceis na realização deste trabalho.

À amiga **Gisele Gouveia**, presente em todos os meus momentos deste trabalho, pelo carinho e exemplo de dedicação, por estar sempre disposta a me ajudar com seus conhecimentos técnicos, por nossos momentos de descontração.

À **Renata Kikuchi**, pela sua amizade, por sua excelência profissional e pelo auxílio técnico em um segmento da pesquisa em biologia molecular.

À **Lis Vilela**, que, com muita descontração, sabedoria e competência, me ensinou as técnicas utilizadas no laboratório de imunopatologia.

À **Lucilla**, carinhosamente chamada de dona Lú, pelo auxílio na busca de prontuários dos pacientes e pela atenção prestada.

A todos os funcionários do **LIM-31** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que, com muita competência, contribuíram num segmento deste trabalho.

À enfermeira **Sônia**, pelo auxílio e apoio na seleção dos doadores de plaquetas por aférese da Fundação pró-sangue Hemocentro de São Paulo.

À minha amiga especial **Márcia**, por estar sempre disposta a me ouvir, pelo seu carinho e pela atenção.

Aos colegas do laboratório, em especial: **Marcela, Leonardo, Milton, Priscila, Rafael, Conceição** e **Soleide**, pelos seus pequenos e grandes favores, e pela paciência e atenção que sempre me dedicaram.

À **minha família**, por me dar apoio incondicional e o conforto necessário em todos os meus momentos difíceis, pilares de minha estrutura emocional e formação pessoal, meu eterno agradecimento.

A todos os **portadores do vírus HTLV-1**, que, apesar das dificuldades trazidas pela doença, não comprometeram suas esperanças, e, mesmo num momento de luta, ainda colaboraram com este trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo auxílio financeiro, imprescindível para a realização dessa pesquisa.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação: Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3^a Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Objetivos	4
1.2 Objetivos Secundários	4
2 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 Vírus Linfotrópico T Humano Tipo-1.....	6
2.1.1 Histórico	6
2.1.2 Epidemiologia	7
2.1.3 Transmissão	8
2.1.4 Aspectos biológicos e ciclo viral	9
2.2 Leucemia/Linfoma de células T do Adulto	12
2.2.1 Patogênese da ATL	15
2.3 Controle do ciclo celular	16
2.3.1 Gene transformador do tumor da pituitária (PTTG)/hSecurina	17
2.3.2 Conteúdo de DNA e Citometria de Fluxo	18
3 MÉTODOS	21
3.1 Casuística	21
3.1.1 Critérios de seleção	22
3.2 Coleta e processamento da amostra	22
3.3 Descongelamento celular e teste de viabilidade.....	23
3.4 Separação de células com partículas magnéticas	23
3.5 DNAploidia	25
3.6 Biologia Molecular	29
3.6.1 Extração RNA.....	29
3.6.2 Síntese do DNA complementar	30

3.6.3 Curva padrão de eficiência.....	31
3.6.4 PCR em tempo real (RT-PCR)	31
3.6.5 Análise Estatística	33
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Casuística	35
4.2 DNA ploidia	37
4.3 Expressão do gene hSecurina.....	40
4.3.1 Correlação de hSecurina e ciclo celular	43
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO	52
7 ANEXOS	55
7.1 Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	55
7.2 Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	59
7.3 Anexo C – Dados clínicos e epidemiológicos pacientes Leucemia T do Adulto	63
7.4 Anexo D - Dados clínicos e epidemiológicos portadores assintomáticos HTLV-1	64
7.5 Anexo E – Resultados de DNAploidia e do gene hSecurina no grupo CT em TCD4+	65
7.6 Anexo F - Resultados de DNAploidia e do gene hSecurina no grupo CT em linfócitos TCD8+.....	66
7.7 Anexo G - Resultados de DNAploidia e do gene hSecurina no grupo HTLV-1 em linfócitos TCD4+	67
7.8 Anexo H - Resultados de DNAploidia e do gene hSecurina no grupo HTLV-1 em linfócitos TCD8+	68
7.8 Anexo I - Anexo I - Resultados de DNAploidia e do gene hSecurina no grupo ATL em linfócitos TCD4+	69
7.8 Anexo J - Resultados de DNAploidia e do gene hSecurina no grupo ATL em linfócitos TCD8+	70
8 REFERÊNCIAS	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

APC	Complexo promotor de anáfase
APC/C	Complexo/ciclossomo promotor de anáfase
ATL	Leucemia/linfoma de células T do Adulto
CDKs	Quinases dependentes de ciclinas
CMN	Células mononucleares
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNAploidia	Conteúdo de DNA
dp	Desvio padrão
<i>et al.</i>	e outros
FBS	Soro Fetal Bovino
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FPSHSP	Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo
GUSB	Glucuronidase beta
HAM/TSP	Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical
HBZ	<i>bZIP factor</i>
HC	Hospital das Clínicas
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HSPGs	Heparan Sulfato Proteoglicanas
HTLV-1	Vírus linfotrópico T humano tipo-1
HTLV-2	Vírus linfotrópico T humano tipo-2
HTLV-3	Vírus linfotrópico T humano tipo-3
HTLV-4	Vírus linfotrópico T humano tipo-4
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IDNA	Índice de DNAploidia
IL-2	Interleucina-2
IL-2R	Receptor Interleucina-2
Kb	Kilobase

LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
MTOC	Centro de organização do microtubo
PDGF	Fator de crescimento de fibroblasto
PI	Iodeto de propideo
pRB	Proteína retinoblastoma
PTTG	Gene Transformador do Tumor da Pituitária
RSV	Vírus do sarcoma de ROUS
STLV-3	Vírus linfotrópico de células T de símio tipo-3

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição Geográfica do foco da infecção pelo HTLV-1. Fonte: Gessain A e Cassar O, 2012	7
Figura 2	Prevalência em doadores de sangue no Brasil. Fonte: Catalan- Soares, <i>et al.</i> , 2005	8
Figura 3	Representação esquemática da partícula HTLV-1/2	9
Figura 4	Estrutura do genoma do HTLV-1. Linhas contínuas indicam os éxons e as tracejadas indicam os íntrons. Acima de cada linha, visualizam-se os nomes de genes e proteínas.....	10
Figura 5	Replicação do ciclo do vírus HTLV-1.....	12
Figura 6	Manifestações dermatológicas da ATL na pele. A – Eritrodermia; B – Lesões Tumerais; C - Pápulas.....	13
Figura 7	Distensão de sangue periférico em aumento de 100X evidenciando “ <i>flower cell</i> ” de paciente ATL forma aguda, acompanhado no serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.	14
Figura 8	Esquema ilustrativo da separase e inibição pela Securina. A separação das cromátides é dependente da clivagem da coesina pela separase O complexo APC participa dessa ativação promovendo a destruição da securina.....	18
Figura 9	Representação do histograma de DNAploidia	19
Figura 10	Comprovação da separação celular dos subtipos linfocitários TCD8+ por citometria de fluxo em indivíduo saudável. (Citogramas bidimensionais em <i>dot plot</i> fluorescência 1 (Fl-1) no eixo da abscissa e fluorescência 2 (FL2) ou FL-3 no eixo da ordenada evidenciando em A) controle isotípico, B) número de linfócitos T CD3+/CD4 no quadrante superior direito e linfócitos TCD3+/CD4- no quadrante superior esquerdo TCD4 (B). C) controle isotípico e D) linfócitos T CD3+/CD8+ no quadrante superior direito.....	25

Figura 11	Ajuste dos detectores do citômetro de fluxo com partículas CEN. Imagem ilustrativa da aquisição em FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA). A) Citograma demonstrando agregados CEN em gráfico <i>dot plot</i> com escala linear contendo o parâmetro FL2-W no eixo das abscissas e FL2-A no eixo das ordenadas. B) Ajuste de forma arbitrária do primeiro canal do pico correspondente às partículas CEN no eixo das abscissas para o número 200. C) Histograma de FL2-A da partícula CEN demonstrando resolução e linearidade. D) Histograma para cálculo linearidade usando a média de M1/M2.	27
Figura 12	Ajuste dos detectores do citômetro de fluxo com as partículas CTN. Imagem ilustrativa da aquisição em FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA). A) Citograma linear de fluorescência contendo o parâmetro FL2-W no eixo das abscissas e FL2-A no eixo das ordenadas demonstrando uma região (gate) somente com núcleos isolados. B) Histograma unidimensional contendo o parâmetro FL2-A no eixo abscissa e com eventos somente de uma região excluindo partículas com falso conteúdo de DNA. C) Histograma para cálculo linearidade usando a média de M1/M2.	27
Figura 13	Imagem representativa de DNA ploidia em indivíduo saudável. Histograma unidimensional em escala linear contendo no eixo da abscissa o canal e o número de células na ordenada representando as fases do ciclo celular.	29
Figura 14	Distribuição das formas clínicas da ATL segundo Shimoyama (1991)	36
Figura 15	Resultado demonstrando histograma de DNA ploidia evidenciando presença de pico aneuploide (hiperdiploide) (seta) em linfócitos TCD4+ em ATL.	39
Figura 16	Resultado demonstrando em histograma de DNA ploidia evidenciando presença de pico aneuploide (hiperdiploide) (seta) em linfócitos TCD8+ em ATL.	39
Figura 17	Porcentagem do IDNA diploide e aneuploide em linfócitos TCD4+ e TCD8+. A comparação entre os grupos não revelou diferença estatística em linfócitos TCD4+ ($p=0,166$) e linfócitos TCD8+ ($p=0,603$).	40
Figura 18	O gráfico representa a mediana da expressão de hSecurina em linfócitos TCD4+ e TCD8+ de acordo com os grupos. Observa-se, nos casos de ATLL, hiperexpressão de hSecurina nos casos TCD4+ diploide ($p=0,008$) e aneuploide ($p=0,042$), e em ATLL TCD8+ diploide ($p=0,006$) e aneuploide ($p=0,014$), respectivamente.	42

- Figura 19** Gráfico da correlação entre o número de células em G₀/G₁ e expressão hSecurina em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Os subgrupos HTLV-1 (p=0,018) e ATL (p=0,040) revelaram correlações inversamente proporcionais entre o número de células em G₀/G₁ e expressão hSecurina em linfócitos TCD4⁺. Houve uma correlação significativa entre o número de células em G₀/G₁ e expressão hSecurina em linfócitos TCD8⁺ no grupo ATL quando comparado entre CT (p=0,012) e HTLV-1 (p=0,027). No subgrupo ATL em linfócitos TCD8⁺, foi observada uma correlação inversamente proporcional entre o número de células em G₀/G₁ e expressão hSecurina (p=0,003). 43
- Figura 20** Gráfico de correlação entre o número de células em fase “S” e expressão hSecurina em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺. Não houve correlações significativas em TCD4⁺ entre os grupos. No subgrupo HTLV-1 (p=0,001), houve correlação positiva entre o número de células em fase “S” e expressão hSecurina. Em linfócitos TCD8⁺, foi observada, no grupo ATL, uma correlação significativa entre o número de células em fase “S” e expressão hSecurina em comparação ao CT (p=0,004) e HTLV-1 (p=0,003). O subgrupo ATL revelou uma correlação positiva entre o número de células em fase “S” e expressão hSecurina (p=0,001). 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios diagnósticos dos subtipos de ATL.....	13
Tabela 2	Critérios para definição de ATL.....	15
Tabela 3	Preparo do RT Master Mix.....	31
Tabela 4	Sequência de primers utilizados para RT-PCR	32
Tabela 5	Características demográficas da população estudada.....	35
Tabela 6	Características demográficas da população estudada para hSecurina	36
Tabela 7	Proporção de células encontradas nas fases do ciclo celular TCD4+	37
Tabela 8	Proporção de células em TCD8+ nas fases do ciclo celular.....	38
Tabela 9	Valores encontrados da expressão hSecurina em linfócitos TCD4+ e TCD8+.....	41
Tabela 10	Valores da expressão hSecurina em comparação IDNA TCD4+ e TCD8+	42

RESUMO

Ferreira MCM. *Estudo da expressão do gene hSecurina e quantificação do índice de DNA em portadores assintomáticos do vírus linfotrópico T humano tipo 1 e pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUÇÃO: A Leucemia/linfoma de células T do Adulto (ATL) é uma doença maligna de fenótipo T CD3+/CD4+/CD25+/CD7- e, geneticamente, apresenta cariótipo complexo e aneuploidia. Clinicamente muito agressiva e ainda incurável, está associada ao vírus linfotrópico T humano do tipo-1 que, preferencialmente, infecta linfócitos T CD4+. Dos indivíduos portadores do HTLV-1, somente 3-5% irão evoluir para ATL e após longo período de latência. Entretanto, os fatores virais ou do hospedeiro que estão associados com a progressão para ATL permanecem desconhecidos. O proto-oncogene hSecurina é um regulador mitótico importante para o processo de segregação cromossômica durante a separação das cromátides irmãs e está envolvido na patogênese de vários tumores. Com o objetivo de avaliar o conteúdo de DNA, o ciclo celular e a expressão do gene hSecurina em células T CD4+ e CD8+ dos portadores assintomáticos do HTLV-1 em comparação com ATL e indivíduos saudáveis, nos propusemos a realizar o presente estudo. **MÉTODOS:** Foram avaliados 38 portadores assintomáticos do HTLV-1, 20 casos de ATL pareados por sexo e idade com 35 indivíduos saudáveis. Foram estudados, individualmente, os subtipos linfocitários T CD4+ e CD8+, sendo o ciclo celular avaliado por citometria de fluxo e a expressão do gene hSecurina pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em Tempo Real. **RESULTADOS:** Neste estudo, observamos parada de maturação de linfócitos T CD4+ na fase G₀/G₁ em portadores assintomáticos do HTLV-1 com diferença estatisticamente significativa em comparação aos grupos-controle (p=0,041) e ATL (p=0,023). No grupo de portadores assintomáticos, observamos correlação inversa entre a porcentagem de células em G₀/G₁ e expressão de hSecurina (p=0,018) em linfócitos T CD4+. Porém, neste mesmo grupo, houve correlação direta entre porcentagem de células em fase S e expressão de hSecurina em linfócitos T CD4+ (p=0,001). Como esperado, observou-se maior fase S em ATL em comparação aos grupos-controle (p=0,020) e portador do HTLV-1 (p<0,001). **CONCLUSÃO:** Neste estudo, demonstramos que linfócitos T CD4+ de portadores assintomáticos do vírus HTLV-1 apresentam atraso no ciclo celular com aumento de células na fase G₀/G₁. Este retardo da progressão do ciclo celular correlacionou-se de forma inversamente proporcional à expressão do gene hSecurina.

Descritores: vírus 1 linfotrópico T Humano; leucemia-linfoma de células T do adulto; ciclo celular; aneuploidia; securina; citometria de fluxo.

SUMMARY

Ferreira MCM. *Study of the expression of the gene hSecurin and quantification of index DNA in asymptomatic human T-lymphotropic virus 1 carriers and patients with adult T-cell leukemia / lymphoma* [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

INTRODUCTION: Adult T-Cell Leukemia (ATL) is a malignant disease of the CD3⁺/CD4⁺/CD25⁺/CD7⁻ T-lymphocytes and genetically features complex karyotypes and aneuploidy. It is a clinically aggressive disease, which is yet incurable. It is associated with the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) that preferentially infects CD4⁺ T-lymphocytes. Among all individuals that carry HTLV-1, only 3-5% will develop ATL and that too after a long latency period. However, the viral or host factors that are associated with the progression of ATL remain unknown. The proto-oncogene hSecurin is an important mitotic regulator for the process of chromosome segregation during sister chromatid separation and is involved in the pathogenesis of various tumors. We decided to conduct this study in order to analyze the DNA content, cell cycle, and expression of the hSecurin gene in CD4⁺ and CD8⁺ T cells of asymptomatic HTLV-1 carriers compared with that in ATL and healthy individuals. **METHODS:** We evaluated 38 asymptomatic HTLV-1 carriers, 20 patients with ATL, and 35 healthy subjects paired by sex and age. We individually studied the lymphocyte subtypes T CD4⁺ and CD8⁺; their cell cycles were evaluated by flow cytometry, and the expression of the hSecurin gene was analyzed using quantitative real time polymerase chain reaction. **RESULTS:** We observed lymphocyte maturation arrest in CD4⁺ T cells in the G₀/G₁ phase of asymptomatic HTLV-1 carriers with a statistically significant difference compared to that in the control (p = 0.041) and ATL (p = 0.023) groups. In the asymptomatic HTLV-1 carrier group, we also found an inverse correlation between the percentage of cells in G₀/G₁ phase and the hSecurin expression (p = 0.018) in TCD4⁺ lymphocytes. However, in this same group, there was also a direct correlation between the percentage of S phase cells and hSecurin expression in TCD4⁺ lymphocytes (p = 0.001). As expected, there was a higher number of S phase cells in the ATL group compared to that in the control (p = 0.020) and asymptomatic HTLV-1 carrier (p < 0.001) groups. **CONCLUSION:** In this study, we demonstrated that CD4⁺ T lymphocytes from asymptomatic HTLV-1 virus carriers present cell cycle arrest with increased G₀/G₁ phase cells. This delay in cell cycle progression correlated inversely with the expression of the hSecurin gene.

Descriptors: human T-lymphotropic virus 1; leukemia-lymphoma adult T-cell; cell cycle; aneuploidy; securin; flow cytometry.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A Leucemia/linfoma de células T do Adulto (ATL) foi descrita como entidade clínica em 1977 em Kyoto, Japão¹. A ATL é uma agressiva e incurável doença causada pelo vírus linfotrópico T humano tipo-1 (HTLV-1) que infecta os linfócitos CD4+ e CD8+. Frequentemente, apresenta fenótipo T maduro CD3+/CD4+/CD25+/CD7-. O HTLV-1, primeiro retrovírus humano descrito, foi isolado a partir da cultura de células do sangue periférico de paciente com Micose Fungoide/Síndrome de Sesary por pesquisadores Americanos em 1980². Atualmente, 5 a 10 milhões de pessoas em todo mundo estão infectadas pelo HTLV-1³. Sua prevalência varia com a área geográfica, com altas taxas no Sudoeste do Japão, Melanésia, África equatorial, Caribe e América do Sul. O Brasil com 2,5 milhões de indivíduos infectados é o maior em número absoluto⁴. Embora a maioria dos indivíduos infectados permaneça assintomática, estima-se que 2-6% dos portadores do vírus HTLV-1 desenvolvam ATL⁵, assim como a síndrome inflamatória do sistema nervoso central, denominada Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP)⁶.

O modo de transmissão pelas vias parenteral por transfusão de sangue e compartilhamento de agulhas contaminadas, sexual e durante a amamentação.

Os indivíduos infectados, geralmente, desenvolvem doença após longo período de latência de 20 a 30 anos. A baixa incidência de doenças associadas ao HTLV-1 e o longo período de latência sugerem que eventos genéticos secundários são importantes para o desenvolvimento e progressão da ATL⁷.

Após a infecção, o HTLV-1, eleva seu número de cópias por nova infecção ou pela proliferação das células infectadas. A expressão da oncoproteína Tax é fundamental e necessária para a transformação neoplásica^{8,9}. Trata-se de uma proteína regulatória crítica para a replicação viral e transformação da célula T¹⁰. É potente ativadora da expressão de genes viral e celular, de forma que seu potencial oncogênico depende da habilidade de alterar a expressão de genes envolvidos no crescimento e na proliferação celular e interação direta com reguladores do ciclo

celular. A instabilidade genômica é uma característica das células transformadas pelo HTLV-1 por ação da Tax, a qual induz ativação precoce dos reguladores do ciclo celular, causando aberrações mitóticas e aneuploidia. Estudos demonstraram que a Tax também atua em proteínas das células do hospedeiro que controlam o *checkpoint* do fuso mitótico¹¹. Esse *checkpoint* regula a segregação cromossômica e a divisão nuclear¹². Entretanto, as alterações nos mecanismos de regulação da segregação cromossômica não são suficientes para a alta frequência de alterações aneuploidia encontradas em cânceres humanos¹³.

A fisiopatologia da ATL ainda permanece obscura no que concerne ao desenvolvimento da doença em portadores assintomáticos. Para tentar esclarecer os mecanismos de aneuploidia em ATL, nos propusemos a estudar a expressão do gene da hSecurina, um dos responsáveis pela separação das cromátides irmãs durante a anáfase em portadores assintomáticos e em doentes com ATL.

O Gene Transformador do Tumor da Pituitária (PTTG) (Pds1/hSecurina) é um oncogene descrito, inicialmente, em tumor hipofisário¹⁴. Em humanos, codifica uma proteína que sequestra o ativador de separação das cromátides irmãs. Encontra-se expresso em tumores da pituitária e outras neoplasias, como câncer de cólon, glioma, tireoide¹⁵, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica¹⁶ e ATL. Na maioria dos tumores sólidos, a instabilidade cromossômica está associada a ganho ou à perda de cromossomos levando à aneuploidia. A Securina pode ligar-se ao gene p53 causando o bloqueio da apoptose e acúmulo de DNA danificado. A proteína viral Tax pode interferir com o complexo/ciclossoma promotor de Anáfase (APC/C) produzindo instabilidade cromossômica por ação direta sobre a hSecurina, o que poderia justificar a aneuploidia existente na ATL¹⁰.

Como as células malignas da ATL apresentam caracteristicamente cariótipo complexo e aneuploidia, nos propusermos a analisar o conteúdo de DNA e a fração de células nas diferentes fases do ciclo celular por citometria de fluxo, bem como, a expressão do gene hSecurina nos subtipos linfocitários TCD4+ e TCD8+ em portadores assintomáticos do HTLV-1 em comparação com pacientes com ATL e indivíduos saudáveis.

1.1 Objetivos

- Quantificar a expressão do gene transformador do tumor da pituitária/hSecurina nos subtipos linfocitários TCD4+ e TCD8+ de portadores assintomáticos do vírus HTLV-1 e pacientes com ATL, comparando com indivíduos saudáveis.
- Correlacionar a expressão do gene transformador do tumor da pituitária/hSecurina com o índice de DNAploidia nos subtipos linfocitários TCD4+ e TCD8+ de portadores assintomáticos do vírus HTLV-1 e pacientes com ATL.

1.2 Objetivos Secundários

- Analisar as fases do ciclo celular nos subtipos linfocitários TCD4+ e TCD8+ entre portadores assintomáticos do vírus HTLV-1 em comparação com pacientes com ATL e indivíduos saudáveis.

2 Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Vírus Linfotrópico T Humano Tipo-1

2.1.1 Histórico

Em 1909, Peyton Rous identificou o aparecimento de sarcomas em galinhas, que, mais tarde, ficou conhecido como o vírus do sarcoma de ROUS (RSV)¹⁷. Após este fato, elevou o interesse da comunidade científica em estudar os retrovírus. Na metade da década de 70, após a descoberta da transcriptase reversa e dos fatores de crescimento de células T, mais tarde denominada interleucina-2 (IL-2)¹⁸, possibilitaram a Poiesz e colaboradores, em 1980, identificar e descrever o primeiro retrovírus humano, que foi isolado a partir da cultura de células do sangue periférico de paciente com Micose Fungode/Síndrome de Sesary, denominado de vírus linfotrópico T humano tipo-1². Pesquisadores estudaram o retrovírus de forma independente no Japão e nos Estados Unidos. Em paralelo a esta descoberta, estudos realizados por Kiyoshi Takatsuki e seus colaboradores no Japão em 1976, associaram o vírus à leucemia/linfoma de células T do adulto¹. Em 1982, um segundo vírus, denominado vírus linfotrópico T humano tipo-2 (HTLV-2), foi isolado a partir de uma linhagem celular de células esplênicas de um paciente com leucemia de células pilosas¹⁹.

Em 2005, foram descritos dois novos retrovírus humanos, denominados de vírus linfotrópico T humano tipo-3 (HTLV-3) e vírus linfotrópico T humano tipo-4 (HTLV-4), ambos encontrados em indivíduos habitantes do Sul da República de Camarões²⁰, e o HTLV-3 geneticamente semelhante ao vírus linfotrópico de células T de símio tipo 3 (STLV-3). Um quarto tipo de HTLV (HTLV-4), um vírus diferente de todos STLV conhecidos, cujo provírus foi obtido em células mononucleares (CMN) de um indivíduo habitante de Camarões²¹.

2.1.2 Epidemiologia

A distribuição geográfica do vírus desde sua descoberta é vista como endêmica em diversas regiões (Figura 1), com cerca de 5-10 milhões de pessoas infectadas pelo mundo³. As principais regiões endêmicas para o HTLV-1 são o Sudoeste do Japão, ilhas do Caribe, a América do Sul e a África equatorial^{22,23}.

Na América do Sul, estimam-se 400 milhões de indivíduos infectados, representando áreas endêmicas de doenças associadas, especialmente no Brasil, no Peru, na Colômbia, no Chile, na Argentina e na Guiana Francesa²⁴.

Figura 1 - Distribuição Geográfica do foco da infecção pelo HTLV-1. Fonte: Gessain A e Cassar O, 2012.

Estima-se que, no Brasil, cerca de 2,5 milhões de indivíduos estejam infectados pelo HTLV-1, este é o maior em número absoluto⁴. Estudo realizado em banco de sangue no período de 1995-2000 no Brasil revelou heterogeneidade entre as médias de prevalência da infecção nos estados brasileiros (Figura 2), sendo 0,4/1000 em Florianópolis, Santa Catarina, e 10,0/1000 no Nordeste e São Luis, Maranhão²⁵. A soroprevalência do HTLV-1 também está associada à idade e ao sexo²⁶. Nos Estados Unidos, em uma coorte de doadores de sangue, observou-se prevalência de 60 anos para ambos os sexos, sendo maior no sexo feminino (24/1000000) em relação ao

sexo masculino (16/100000). Para o HTLV-2, a soroprevalência predominou entre os 40-49 anos para ambos os sexos, também maior no sexo feminino²³.

Figura 2 - Prevalência em doadores de sangue no Brasil. Fonte: Catalan-Soares, *et al.*, 2005.

2.1.3 Transmissão

A transmissão do HTLV-1 ocorre, em geral, pela via de contágio horizontal, por relações sexuais, com maior risco de transmissão do sexo masculino para o feminino^{27,28}. Segundo Kajiyama, em 1986, o risco da transmissão do HTLV-1 entre os casais foi de 60,8% do marido para esposa e o inverso de 0,4% no período de 10 anos²⁹. A via parenteral, por transfusão de sangue e hemocomponentes³⁰, e uso compartilhado de seringas contaminadas também é bastante importante³¹. A transmissão vertical, por transmissão de mãe para filho via amamentação^{32, 33}, é extremamente importante. A taxa de soroconversão em crianças em amamentação depende da carga viral no leite materno, do tempo de amamentação e do grau de compatibilidade do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) classe I da mãe e do

lactente. Esta via é considerada a mais importante, porque é considerado o principal para o desenvolvimento da ATL³⁴.

2.1.4 Aspectos biológicos e ciclo viral

O HTLV-1 é um retrovírus do gênero *Deltaretrovírus*³⁵ da subfamília *Retroviridae*³⁶. Dentro deste gênero, existem, ainda, o HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4. Os retrovírus HTLV-3 e HTLV-4 foram descritos recentemente na África Central e, até o momento, não foram associados a doenças em humanos³⁷.

O vírus HTLV-1 consiste de partícula viral esférica de 100 nanômetros de diâmetro, com capsídeo proteico constituído pelas proteínas p15, p19 e p24 formando o nucleocapsídeo^{38, 39} (Figura 3). O nucleocapsídeo é coberto por um envelope de lipídeos, formado a partir da membrana da célula plasmática da célula hospedeira contendo as glicoproteínas virais. As enzimas transcriptase reversa, protease, integrase e RNase H são essenciais para o estabelecimento da infecção viral e estão presentes no nucleocapsídeo⁴⁰.

Figura 3 - Representação esquemática da partícula HTLV-1/2. Fonte: Modificado de <http://www.upch.edu.pe/Tropicales/capacita/2009/HTLV>.

À semelhança de outros retrovírus, o HTLV-1 possui genoma de duas cópias RNA de fita simples, genoma relativamente pequeno de 9 Kb e os genes antígeno grupo específico (*gag*), polimerase (*pol*) e de envelope (*env*). Possui uma sequência próxima à extremidade 3' denominada região pX contendo os genes reguladores *tax* e *rex*⁴¹. O genoma viral é circundado nas extremidades por regiões repetitivas denominadas *long terminal repeats* (LTRs), contendo as regiões U3, R e U5 com sequências de bases essenciais à integração do DNA proviral ao DNA do hospedeiro e regiões reguladoras de transcrição^{42,43} (Figura 4).

Figura 4 - Estrutura do genoma do HTLV-1. Linhas contínuas indicam os éxons e as tracejadas indicam os íntrons. Acima de cada linha, visualizam-se os nomes de genes e proteínas. Fonte: Modificado de Kannian e Green, 2010.

O HTLV-1 pode infectar vários tipos de células, como os linfócitos T e B, monócitos e fibroblastos⁴⁴. No entanto, a persistência e replicação do HTLV-1 são, preferencialmente, em linfócitos TCD4+ e, menos frequentemente, em linfócitos TCD8+⁴⁵. Após a infecção, o HTLV-1 eleva seu número de cópias por nova infecção ou pela proliferação das células infectadas ou por meio de sua forma livre, cuja infecção é menos eficiente⁴⁶. O transportador de glicose 1 (GLUT-1) foi descrito

como a primeira molécula do complexo de receptores de entrada do vírus na célula e encontra-se presente na superfície de linfócitos TCD4+ e TCD8⁴⁷. Outros receptores, como a Heparan Sulfato Proteoglicanas (HSPGs)⁴⁸ e neuropilina 1, foram descritos posteriormente⁴⁹.

O ciclo de replicação do HTLV-1 inicia-se quando o vírus se adere e penetra nas células do hospedeiro (Figura 5), pela interação entre a GLUT-1 e a glicoproteína gp46 com o complexo de receptores celulares, permitindo a fusão das membranas mediada pela gp 21, e entre o envelope viral e a membrana da célula hospedeira⁵⁰. O capsídeo viral é liberado após a fusão das membranas mediada pela gp21.

Após a infecção, o HTLV-1 se propaga, principalmente, célula a célula. Após o contato de uma célula infectada com outra não infectada, ocorre a polarização do centro de organização do microtubo (MTOC) formando-se uma sinapse, com o acúmulo das proteínas e genomas virais na superfície de contato que se transferem para a célula-alvo⁵¹.

A transcriptase reversa transcreve a fita simples de RNA viral para DNA de fita dupla (cDNA). Este é transportada para o núcleo, em que se insere de forma aleatória ao seu genoma pela ação da integrase viral⁵². Uma vez integrado, proteínas virais como a Tax são expressas. Esta proteína tem função regulatória crítica para a replicação viral e transformação da célula T¹⁰. É potente ativadora da expressão de genes viral e celular, de forma que seu potencial oncogênico depende de sua habilidade de alterar a expressão de genes celulares envolvidos no crescimento e na proliferação celular, e pela interação direta com reguladores do ciclo celular. O gene viral *bZIP factor* (HBZ) é um dos principais responsáveis pela expansão dos linfócitos infectados, pois inibe a expressão da proteína Tax, permitindo que as células infectadas escapem do sistema imune⁵¹.

Figura 5 - Replicação do ciclo do vírus HTLV-1. Fonte: Modificado de Lairmore MD, 2012.

2.2 Leucemia/Linfoma de células T do Adulto

A ATL foi descrita em Kyoto, Japão, em 1977⁵³. É uma doença linfoproliferativa de células T maduras, predominantemente de linfócitos T CD3+/CD4+/CD25+/CD7-⁴². Posteriormente, foi associada à infecção do HTLV-1 em seis imigrantes residentes na Inglaterra⁵⁴. Estima-se que 2-5% dos indivíduos infectados pelo HTLV-I desenvolvem doença após longo período de latência de 40-60 anos e que eventos genéticos secundários são importantes para o desenvolvimento e a progressão da ATL⁵⁵. O contínuo estímulo da proliferação dos linfócitos

infectados por longo período promove o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas no genoma celular, podendo levar à transformação neoplásica do linfócito e ao surgimento de um clone celular de elevada capacidade de proliferação e de sobrevida⁵¹.

A ATL é classificada clinicamente em forma aguda, linfoma, crônica e “*smoldering*”⁵⁶ (Tabela 1). A forma aguda e a forma linfoma são mais agressivas e apresentam mediana de sobrevida global de um ano. As formas crônicas e “*smoldering*” são mais indolentes e, por vezes, assintomáticas, mas podem evoluir para as formas mais agressivas⁵⁷.

Tabela 1 – Critérios diagnósticos dos subtipos de ATL

Achados clínicos/laboratorial	Subtipos da ATL			
	Smoldering	Crônica	Linfoma	Aguda
Anti-HTLV-1 anticorpo	Sim	Sim	Sim	Sim
Linfócitos (4×10^9 /l ou mais)	<4	≥ 4	<4	*
Flowers cells	Variável	Variável	Não	Sim
DHL	$\leq 1.5N$	$\leq 2N$	*	*
Cálcio < 2.74 mmol/l	<2.74	<2.74	*	*
Lesões de pele	**	*	*	*
Linfadenopatia	Não	*	Sim	*
Esplenomegalia	Não	*	*	*

* Não é essencial para esse diagnóstico. N.limite acima do normal

** Não é essencial se outros critérios forem preenchidos.

A doença manifesta-se com envolvimento cutâneo (Figura 6) em todas as formas clínicas de ATL, com frequência de 43-72%⁵⁸, podendo apresentar eritrodermia, placas, pápulas, nódulos, tumores.

Figura 6 - Manifestações dermatológicas da ATL na pele. A – Eritrodermia; B – Lesões Tumorais; C – Pápulas.

Os pacientes podem apresentar linfonodomegalia, hepatoesplenomegalia e leucocitose às custas de células linfóides de moderado tamanho, núcleo convoluto e cromatina pouco densa denominadas de “*flower cell*” (Figura 7).

Figura 7 - Distensão de sangue periférico em aumento de 100X evidenciando “*flower cell*” de paciente ATL forma aguda, acompanhado no serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Segundo Levine e colaboradores (1994), estabeleceram-se os critérios diagnósticos clínicos e laboratoriais para ATL (Tabela 2). Do ponto de vista laboratorial, observam-se presença de anticorpo HTLV-1, integração monoclonal do HTLV-1 ao genoma da célula tumoral, expressão da cadeia α do receptor de IL2, células T com fenótipo aberrante⁵⁹.

Tabela 2 – Critérios para definição de ATL

Definição de ATL	
Critérios clínicos e laboratoriais	
Hipercalcemia	1 ponto
Envolvimento de pele	1 ponto
Fase leucêmica (linfócitos anormais > 2%)	1 ponto
Presença de anticorpo HTLV-1	2 pontos
Leucemia/linfoma de células T	2 pontos
Células T com fenótipo aberrante	2 pontos
Expressão da cadeia α do receptor da IL2	1 ponto
Classificação ATL	
Clássica	≥ 7 pontos
Provável	5 ou 6 pontos
Possível	3 ou 4 pontos
Inconsistente com ATL	< 3 pontos

Fonte: Levine *et al.* 1994

2.2.1 Patogênese da ATL

A transformação de células T pelo HTLV-I resulta em proliferação clonal contínua em linfócitos TCD4+ mediada pela Tax. Esta proteína estimula a síntese de interleucina 2 (IL-2) e de seu receptor (IL-2R)⁴². Além disso, bloqueia genes reparadores de DNA e indutores de apoptose. A proteína Tax exerce atividade mitogênica, especialmente na transição da fase G₁ para a fase S do ciclo celular, em que regula os níveis de ciclina D, das quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e dos inibidores de CDKs. A expressão de Tax é detectada somente em 40% dos pacientes com ATL, o que pode ser explicado pelo fato de ser esta proteína o principal antígeno viral reconhecido pelas células TCD8+ específicas para o HTLV-1⁴⁶. Durante a mitose, a Tax liga-se e ativa prematuramente o complexo promotor de anáfase (APC), promovendo a degradação da securina. Consequentemente, ocorre separação inapropriada das cromátides irmãs causando aneuploidia.

Fatores genéticos individuais também constituem fatores de risco para o desenvolvimento da ATL. Indivíduos com haplótipo HLA-A*26, HLA-B*4002, HLA-B*4006 e HLA-(B4801) tem maior risco de desenvolver ATL. O sistema

imunológico destes indivíduos não consegue reconhecer a proteína Tax e, portanto, não produzem linfócitos T citotóxicos anti-Tax⁶⁰.

2.3 Controle do ciclo celular

O processo do ciclo celular compreende uma sequência complexa de eventos que garante a transmissão do genoma da célula para as células-filhas. O ciclo celular divide-se em quatro fases: fase S (síntese de DNA); fase M (mitose); fases (ou *gaps*) G_1 e G_2 ⁶¹. A fase G_1 ocorre antes da fase S, que precede as G_2 e M. A progressão destas fases é controlada por uma rede hierárquica e complexa que coordena a proliferação celular. As células que se mantêm em estágio quiescente frequentemente referido como G_0 permanecem metabolicamente ativas, porém não se dividem ou apenas se dividem quando estimuladas por sinais extracelulares que sinalize a saída de G_1 ⁶². Ao final de G_1 , um ponto de restrição (R) descrito segundo Pardee⁶³, em 1974, controla a entrada na fase S. A partir dele, as células não dependem da sinalização extracelular passando a ser controlada por proteínas denominadas de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) que são subunidades catalíticas pertencentes à família heterodimérica de enzimas do tipo quinase de serina/treonina envolvidas na progressão do ciclo celular⁶⁴.

Em células de mamíferos, são conhecidas, pelo menos, oito classes de ciclinas e algumas subclasses⁶⁵. As ciclinas e CDK participam da regulação das fases de G_1/S e G_2/M . A expressão de ciclinas do tipo D (D1, D2, e D3), por estímulos extracelulares durante a fase G_1 , ativam, inicialmente, as quinases CDK4 e CDK6 que se encontravam inativas⁶⁶. Após a ativação, as CDK4 e CDK6 passam a atuar sobre seus alvos para a continuação do ciclo. Ao término da fase G_1 , o ponto de restrição leva à progressão da célula para a fase S. O principal alvo é a proteína retinoblastoma (pRb), que se encontra ativa e, portanto, bloqueando a ação do fator de transcrição E2F responsável pela ativação da transcrição de genes e a indução à transcrição das ciclinas A e E. A ciclina E se associa a CDK2 e forma um complexo ciclina D CDK4 e CDK6 para fosforilar a Rb durante a transição da fase G_1 para a fase S⁶⁷.

Os inibidores de CDK2 são divididos em duas classes; os inibidores da família Cip/Kip, composto por p21^{Cip1} ⁶⁸, p27^{Kip1} ⁶⁹ e p57^{Kip2} ⁷⁰, destes, o p27^{Kip1} é o mais ativo e presente em grande quantidade nas células da fase G₀, e, também, considerado gene supressor de tumor. Os inibidores da família INK4 (p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} e p19^{INK4d}), formada por proteínas com repetições *ankyrins*, são específicos para CDK4 e CDK6⁷¹. O p16 é capaz de bloquear a formação de complexos da ciclina D-CDK4 pela associação à parte não catalítica da CDK4 e CDK6, impedindo a fosforilação da proteína Rb, mantendo E2F inativo, impedindo a duplicação do DNA pela célula⁷².

2.3.1 Gene transformador do tumor da pituitária (PTTG)/hSecurina

O Gene Transformador do Tumor da Pituitária (PTTG) (Pds1/hSecurina) é um oncogene descrito inicialmente em tumores hipofisários¹⁴. O PTTG foi identificado como securina de mamíferos, tendo participação na regulação da separação das cromátides irmãs⁷³. O PTTG é hipoexpresso na maioria dos tecidos, sua hiperexpressão está associada à oncogênese e ao desenvolvimento de tumores⁷⁴. A hiperexpressão do PTTG foi descrita em tumores de mama, ovário, útero, cólon e pulmão^{75,76,77}.

A Securina humana é uma proteína de 202 aminoácidos¹⁶, codificada pelo PTTG situado no cromossomo 5q33. Além de regular a divisão celular impedindo a instabilidade genética, induz a expressão do fator de crescimento de fibroblasto (PDGF)-2, do VEGF e outros fatores pró-angiogênicos¹⁵. A hiperexpressão de securina em células NIH3T3 em fibroblastos de ratos causou transformação tumoral⁷⁸.

A securina humana, codificada pelo gene de mesmo nome, sequestra o ativador de separação das cromátides irmãs. Ao ser ubiquitada, a securina torna-se sensível ao APC/C, liberando, então, a separase (Figura 8) que passa a clivar as subunidades das proteínas Scc1, Mcd1, Rad21. Conseqüentemente desfaz a coesão entre os cromossomos e libera a célula em direção à anáfase na qual as cromátides irmãs migram para eixos opostos da célula¹⁶. Desta forma, a degradação da securina

assegura a transição normal da metáfase para a anáfase e a separação adequada dos cromossomos durante a mitose¹⁰. As cromátides irmãs podem migrar para o mesmo polo gerando células-filhas aneuploides em condições patológicas⁷⁹.

Figura 8 - Esquema ilustrativo da separase e inibição pela Securina. A separação das cromátides é dependente da clivagem da coesina pela separase. O complexo APC participa dessa ativação promovendo a destruição da securina. Fonte: Modificado de Horning *et al.*, 2002.

2.3.2 Conteúdo de DNA e Citometria de Fluxo

O conteúdo de DNA (DNAploídia) é uma das aplicações de citometria de fluxo em estudos de doenças hematológicas e tumores sólidos^{80,81}. A utilização de corantes fluorescentes como o iodeto de propídeo (PI) ou outro similar que permitem marcar de forma estequiométrica o DNA das células em suspensão, que, em condições adequadas, emitem um sinal fluorescente proporcional ao DNA de cada célula⁸². A análise de DNAploídia é determinada, graficamente, por histogramas de DNA que retratam a distribuição de diferente conteúdo de DNA nas células⁸³. Esta técnica avalia anormalidades clonais no conteúdo de DNA e a distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular, principalmente a fração de células em síntese de DNA (fase S).

O histograma do conteúdo de DNA é unidimensional com o número de células coradas representadas no eixo vertical em escala linear em função da intensidade de

fluorescência de canais no eixo horizontal (Figura 9). No histograma representativo de DNAploidia, observam-se todas as células em G_1 com o mesmo conteúdo de DNA, e mesma fluorescência teoricamente detectada⁸⁴. O histograma diploide é demonstrado na posição do canal modal de G_0/G_1 que corresponde à quantidade de DNA de cromossomos diploides $2n$ (geralmente expresso como $2c$). Os casos em que os picos diferem de $2c$ ($< 2c$ ou $> 2c$, excluindo $4c$) são referenciados como tendo conteúdo de DNA aneuploide⁸⁵.

Figura 9 - Representação do histograma de DNAploidia

A análise de DNAploidia é expressa pelo índice de DNA (IDNA) que representa o quociente entre as fases G_0/G_1 relativa ao conteúdo de DNA da população anormal pela moda de G_0/G_1 de população normal⁸⁶. O índice de DNA igual a 1,0 é considerado diploide⁸⁷. O ID igual a 1,0 corresponde a 7,18 picogramas de DNA e a 46 cromossomos ($2n$). A lesão tumoral pode ser categorizada como diploide quando o pico de G_0/G_1 no histograma é único e similar com a população das células do tecido normal. O tetraploide: é caracterizado por ID de 1,9 – 2,1⁸⁶. Denomina-se aneuploide, ID de $< 0,95$ e $> 1,05$.

3 Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Casuística

Durante o período de julho de 2009 a dezembro de 2012, foram incluídos no estudo 38 portadores assintomáticos do vírus HTLV-1 e 20 casos de ATL provenientes do serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). A infecção por HTLV-1 foi diagnosticada pelo teste imunoenzimático ELISA (*enzyme linked immunoborbet assay*) com confirmação por *Western blot* (WB). O diagnóstico e a classificação da ATL seguiram os critérios de Levine^{59a} e Shimoyama^{56a}, respectivamente. A pesquisa de rearranjo de clonalidade T foi realizada para os portadores assintomáticos do HTLV-1 e ATL por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase⁸⁹.

Ambos, os grupos de portadores assintomático do HTLV-1 e de ATL foram pareados pelo sexo e idade a um grupo-controle composto por indivíduos saudáveis de doadores de plaquetas por aférese (n=35), com perfil sorológico negativo para Hepatite B, C, Vírus da imunodeficiência humana (HIV), doença de Chagas, HTLV-1/2 e sífilis da Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo (FPSHSP). Todos os participantes receberam informação sobre o objetivo, o método de obtenção da amostra e a contribuição para o estudo. Depois de respondidas todas as dúvidas relacionadas à coleta da amostra e ao estudo, foi obtido e documentado o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” previamente aprovado pela Comissão de Ética (CAPPesp) sob o número 0814/08 (ANEXOS A e B). Paralelamente, foram coletados dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com ATL (ANEXO C) e portadores assintomáticos do HTLV-1 (ANEXO D) a partir do prontuário eletrônico do HC/ICESP da FMUSP.

3.1.1 Critérios de seleção

Abaixo, descrevemos os critérios de inclusão adotados para a seleção do grupo-controle, portadores assintomáticos do HTLV-1 e pacientes com diagnóstico de ATL:

1. Indivíduos saudáveis: doadores de plaquetas por aférese, segundo as normas RDC 153 para doação de sangue (ANVISA);
2. Portadores assintomáticos do vírus HTLV-1: diagnóstico confirmado por exame clínico e laboratorial (*Western blot* positivo para HTLV-1).

Para os portadores assintomáticos do vírus HTLV-1, foram excluídos aqueles que apresentaram sorologia positiva para HIV, diagnóstico laboratorial de *Strongyloides stercoralis* e imunofenotipagem, demonstrando relação TCD4/TCD8 superior aos limites dos valores de referência (0,6-2,8).

No grupo de pacientes com ATL, foram excluídos portadores do HIV.

3.2 Coleta e processamento da amostra

Foram coletados 30 mL de sangue periférico por punção venosa em tubo a vácuo contendo traços de heparina sódica. Imediatamente, procedeu-se à separação das células mononucleares (CMN) por gradiente de concentração com Ficoll-Paque® (GE Healthcare Life Sciences, United Kingdom) diluído à concentração 1:1 com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Para tanto, em um tubo previamente identificado, adicionaram-se três partes de Ficoll-Paque® (GE Healthcare Life Sciences, United Kingdom) para quatro partes de sangue diluído. Em seguida, esse foi centrifugado a 400 x g por 30 minutos à temperatura de 18-20 °C. Após centrifugação, a camada de CMN foi transferida para outro tubo ao qual se adicionaram 6 mL de PBS com posterior homogeneização e centrifugação a 100 x g por 10 minutos a 18-20 °C. O sobrenadante foi removido e as células lavadas em PBS e centrifugadas conforme descrito anteriormente, removendo-se, na sequência, o sobrenadante. A seguir, as células foram congeladas em tubos para congelamento e

armazenadas em freezer a -80°C por 24 horas e, posteriormente, transferidas para nitrogênio líquido. Para este procedimento, as células foram congeladas em meio contendo 1800 μL de Soro Fetal Bovino (FBS) (Gibco, Grand Island, USA) e 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany).

3.3 Descongelamento celular e teste de viabilidade

Amostras criopreservadas foram descongeladas em banho-maria a 37°C , e, em seguida, as células foram transferidas para o meio de RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, USA), seguida de centrifugação 645 x g por 8 minutos. O sobrenadante foi desprezado e adicionado 1 mL de PBS para a quantificação das células em hemocítômetro e realização do teste de viabilidade. Para este teste, foi adicionado 10 μL da suspensão de células e 10 μL de azul tripano (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) diluído 1:10. A seguir, realizou-se a contagem de células em 10 μL da suspensão no hemocítômetro. Em microscópio óptico, foram contadas as células viáveis, não coradas e a não viáveis coradas em azul. Todas as amostras apresentaram viabilidade superior a 90%.

3.4 Separação de células com partículas magnéticas

Os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ foram isolados por seleção positiva pelo método de *cell sorting* em coluna magnética a partir das CMN. Primeiramente, as CMN foram centrifugadas a 200 x g por 10 minutos e ressuspendidas em 80 μL de tampão de separação contendo PBS suplementado com 0,5% albumina bovina fração V (BSA) (INLAB). Em seguida, 1×10^7 CMN/ mm^3 foram marcadas com 20 μL de CD8⁺ *MicroBeads human* (Miltenyi Biotec, Bergich Gladbach, Germany). Após, as células foram homogeneizadas, incubadas por 15 minutos a $4-8^{\circ}\text{C}$ e lavadas com 2 mL de tampão de separação para retirar o excesso de anticorpo monoclonal não ligado. Posteriormente, foram centrifugadas a 300 x g por 10 minutos. As células foram ressuspendidas em 500 μL de tampão de separação. A suspensão celular foi

carregada em coluna MACS LS (Miltenyi Biotec, Bergich Gladbach, Germany), a qual foi colocada em campo magnético do separador MACS (Miltenyi Biotec, Bergich Gladbach, Germany). Para remoção das células não ligadas, a coluna magnética foi lavada três vezes com 3 mL de tampão de separação. As células não ligadas eram separadas do líquido efluente contendo a fração de células depletadas das células CD8+. Em seguida, acrescentaram-se 5 mL de tampão de separação na coluna. Após a remoção da coluna do campo magnético, as células CD8+ retidas magneticamente foram eluídas, como a fração celular selecionada positivamente. Para a obtenção de linfócitos TCD4+, utilizou-se a mesma técnica descrita anteriormente, mas com 20µL de CD4+ *MicroBeads human* (Miltenyi Biotec, Bergich Gladbach, Germany).

A eficiência de cada separação foi avaliada pela marcação com AcMo CD4 *fluorescein isothiocyanate* (FITC)/CD8 *phycoerythrin* (PE)/CD3 *peridinin chlorophyll protein* (PerCP) (Becton Dickinson, San Jose, CA) adquiridos e analisados em citômetro de fluxo FACS Calibur® (Becton Dickinson, San Jose, CA) (Figura 10), utilizando-se o *software* CELL-Quest Pro (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Figura 10 - Comprovação da separação celular dos subtipos linfocitários TCD8+ por citometria de fluxo em indivíduo saudável. (Citogramas bidimensionais em *dot plot* fluorescência 1 (FL1) no eixo da abscissa e fluorescência 2 (FL2) ou FL-3 no eixo da ordenada evidenciando em A) controle isotípico, B) número de linfócitos T CD3+/CD4 no quadrante superior direito e linfócitos TCD3+/CD4- no quadrante superior esquerdo TCD4 (B). C) controle isotípico e D) linfócitos T CD3+/CD8+ no quadrante superior direito.

3.5 DNAploidia

Antes da utilização do citômetro de fluxo FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA), monitoramos seu desempenho com as partículas BD CaliBRITE™ (Becton Dickinson, San Jose, CA), ajustando-se a compensação da fluorescência e a sensibilidade.

Após a separação dos subtipos linfocitários TCD4+ e TCD8+ com as partículas magnéticas, procedeu-se à marcação das células com o reagente *Cycle-Test*[®] plus *DNA Reagent Kit* (Becton Dickinson, San Jose, CA). Para tanto, 5×10^5 células CD4+ ou CD8+ foram adicionadas em tubos previamente identificados como controle e teste. A suspensão celular foi lavada com 3 mL da solução *Cycle TESTTM Plus Buffer* por centrifugação a 300 x g por 5 minutos à T.A. Em seguida, foram adicionados a cada tubo 250 µL da solução A (*CycleTESTTM Plus solution A*) (tampão de tripsina) e incubados 10 minutos à T.A. Na sequência, adicionaram-se 200 µL de solução B (*CycleTESTTM Plus solution B*) (inibidor de tripsina e tampão RNase) a cada tubo. Esses foram incubados 10 minutos à T.A. com posterior adição de 200 µL de solução C (*CycleTESTTM Plus solution C*) contendo iodeto de propídio (PI), o qual se intercala ao DNA das células em suspensão. A seguir, os tubos foram incubados 10 minutos a 2-8 °C e mantidas nesta temperatura até o momento da aquisição.

O desempenho óptico do citômetro de fluxo foi monitorado com as partículas de controle DNA QC Particles[®] (Becton Dickinson, San Jose, CA). As partículas CEN (*chicken erythrocyte nuclei*) são compostas por núcleos isolados e agregados (*doublets, triplets*, ou agregados maiores), e são utilizadas para calibrar a linearidade e a resolução do aparelho (Figura 11). As partículas CTN (*calf thymocyte nuclei*), são formadas por núcleos em várias fases do ciclo celular ($G_0/G_1, S, G_2M$) e são utilizadas como controle para discriminação de agregados celulares (Figura 12).

A preparação das partículas CEN e CTN foi realizada pela adição de 500 µL de iodeto de propideo DNA QC Particles[®] Propidium Iodide (Becton Dickinson, San Jose, CA) a cada tubo identificado como CEN e CTN, seguido da adição de 5 µL de DNA QC Particles[®] chicken erythrocyte nuclei (Becton Dickinson, San Jose, CA) ao tubo CEN e 5 µL de DNA QC Particles[®] calf thymocyte nuclei (Becton Dickinson, San Jose, CA) ao tubo CTN). A seguir, os tubos foram incubados 10 minutos a TA e, depois, mantidos a 2-8 °C até o momento da aquisição.

Figura 11 - Ajuste dos detectores do citômetro de fluxo com partículas CEN. Imagem ilustrativa da aquisição em FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA). A) Citograma demonstrando agregados CEN em gráfico *dot plot* com escala linear contendo o parâmetro FL2-W no eixo das abscissas e FL2-A no eixo das ordenadas. B) Ajuste de forma arbitrária do primeiro canal do pico correspondente às partículas CEN no eixo das abscissas para o número 200. C) Histograma de FL2-A da partícula CEN demonstrando resolução e linearidade. D) Histograma para cálculo linearidade usando a média de M1/M2.

Figura 12 - Ajuste dos detectores do citômetro de fluxo com as partículas CTN. Imagem ilustrativa da aquisição em FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA). A) Citograma linear de fluorescência contendo o parâmetro FL2-W no eixo das abscissas e FL2-A no eixo das ordenadas demonstrando uma região (gate) somente com núcleos isolados. B) Histograma unidimensional contendo o parâmetro FL2-A no eixo abscissa e com eventos somente de uma região excluindo partículas com falso conteúdo de DNA. C) Histograma para cálculo linearidade usando a média de M1/M2.

A aquisição das partículas de CEN e CTN foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCaliburTM (Becton Dickinson, San Jose, CA) após ajustes dos detectores FL2, FL2-W e FL2-A até o encaixe das partículas CEN no canal 200 de FL-2 Width e FL2-Area no módulo *setup* do programa. Depois, foram adquiridos 10.000 eventos deste tubo em velocidade *LOW* no máximo 200 eventos/segundo. Os marcadores dos histogramas foram ajustados para conter mais de 90% de partículas para a determinação do coeficiente de variação. As voltagens dos detectores estabelecidos com o tubo CEN foram mantidas para a aquisição do tubo CTN também em velocidade *LOW*, até 200 eventos/segundo.

Após este procedimento, o tubo controle para DNAploidia foi adquirido após ajuste dos detectores FL2, FL2-A e FL2-W, posicionando-se a população G_0/G_1 no canal 200 do histograma FL2-A. Foram adquiridos 10.000 eventos em velocidade *LOW*, com até 200 eventos/segundo. A mesma calibração foi usada para aquisição das amostras testes. A análise foi realizada em histograma unidimensional com FL2-A no eixo das abcissas e número de eventos no eixo das ordenadas. Os valores foram obtidos diretamente do programa *ModFit* LT Macintosh (Copyright 1993-1996 by Verity Software House Inc, Topsham -USA).

Para a análise do índice de DNA ploidia (IDNA), consideramos a medida do conteúdo de DNA da população de células quiescentes (G_0/G_1) em relação ao conteúdo de DNA diploide. Histogramas exibindo apenas um canal de população de células em G_0/G_1 foram classificados como diploides (IDNA igual a um) (Figura 13). Os histogramas com IDNA $< 0,95$ ou $> 1,05$ com mais de 10% de eventos foram classificados como aneuploides⁸⁶.

Figura 13 - Imagem representativa de DNA ploidia em indivíduo saudável. Histograma unidimensional em escala linear contendo no eixo da abscissa o canal e o número de células na ordenada representando as fases do ciclo celular.

3.6 Biologia Molecular

3.6.1 Extração RNA

O RNA total dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ isolados na coluna imunomagnética foi extraído pelo método guanidino-isotiocianato-fenol-clorofórmio com o reagente TRIzol[®] Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)⁹⁰.

No momento da extração de RNA, inicialmente, as células TCD4⁺ e TCD8⁺ foram descongeladas do TRIzol[®] Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) a TA, com posterior adição de 200µL de clorofórmio (Merck Chemicals, Brazil) seguida de homogeneização brusca e repouso por 3 minutos a TA. A seguir, as células foram centrifugadas a 11800 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo RNA foi transferido para outro tubo de 1,5 mL previamente identificado. Em seguida, adicionaram-se 500µL de isopropanol (Merck Chemicals, Brazil), homogeneizando delicadamente, seguido de incubação por 10 minutos à TA para promover precipitação do RNA. Procedeu-se a uma segunda centrifugação a 11800 x g por 10 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante, lavando-se o RNA em 1 mL de etanol a 75% diluído em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) por 5

minutos a 7400 x g e 4°C. Finalmente, o sobrenadante foi, novamente, desprezado e o RNA, então, ressuspendido em 20µL de água DEPC. Após o término da extração de RNA total, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop®, Corbett, EUA) por leitura de absorbância em comprimentos de onda de 260 nm, 280nm e 230nm. A razão A_{260}/A_{280} avaliou as contaminações por proteínas e A_{260}/A_{230} por outros compostos orgânicos como o fenol, sais e polissacarídeos. Foram consideradas como tendo RNA puro, amostras com a razão A_{260}/A_{280} entre 1,8 a 2,0.

3.6.2 Síntese do DNA complementar

O RNA de todas as amostras foi tratado para remoção de restos de DNA genômico com o reagente da Promega Corporation (Madison, WI, USA). O tratamento foi realizado com 1000ng de RNA diluído em água DEPC em volume final de 8µL. Ao RNA diluído foi acrescentado 1µL de tampão de RQ1 RNase Free DNase 10x *Reaction Buffer* (Promega Corporation, Madison, WI, USA) e 1µL de RQ1 RNase-Free DNase (Promega Corporation, Madison, WI, USA) para a digestão do DNA genômico, seguido por incubação a 37 °C por 30 minutos. Após este período, foi adicionado 1µL de RQ1 DNase Stop Solution (Promega Corporation, Madison, WI, USA) para a inativação da enzima e incubação final a 65 °C por 10 minutos.

Para o estudo da expressão do gene hSecurina, realizou-se a síntese de cDNA do RNA total dos linfócitos TCD4+ e TCD8+ tratadas previamente com DNase. A transcrição reversa para a obtenção do cDNA foi realizada pela enzima MultiScribeTM Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando-se o reagente High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Conforme descrito (Tabela 3), as concentrações para o preparo do RT Master Mix têm volume final de 20µL.

Tabela 3 – Preparo do RT Master Mix

Reagente	Volume (µL)
10X RT Buffer	4
25x dNTP Mix (100 mM)	1,6
10X RT Random Primers	4
MultiScribe TM Reverse Transcriptase	2
H ₂ O Nuclease-free	8,4
Total por reação	20

As reações de cDNA foram realizadas pela amplificação a 25°C por 10 minutos, a 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos no equipamento Veriti Thermalcycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

3.6.3 Curva padrão de eficiência

A construção da curva padrão para avaliar a eficiência de amplificação do gene endógeno glucuronidase beta (GUSB) (Applied Biosystems, código 433767F) e o *primers* da hSecurina foi realizada em triplicata a partir do cDNA da linhagem celular KG1 em 5 diluições seriadas de 1:10. As reações foram submetidas a condições ideais para PCR em tempo real com a adição de iniciadores específicos. O cálculo de eficiência foi realizado com base no valor do *slope* encontrado na curva feita pelo *software*.

3.6.4 PCR em tempo real (RT-PCR)

A RT-PCR para o gene hSecurina foi realizada com o sistema TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, código - 4304437). O desenho de primers e as sondas utilizadas foram descritas conforme Auner e colaboradores¹⁶ (Tabela 4).

Tabela 4 – Sequência de primers utilizados para RT-PCR

Gene	Primers	Seqüência (5' - 3')
	SENDO	GAAGACTGTTAAAGCAAAAAGCTCTGTA
hSecurin	ANTISENDO	GGCAGGTCAAAACTCTCAAAGTCTA
	Sonda	R-CCTGCCTCAGATGATGCCTATCCAGAAA-Q

R indica o fluorocromo VIC e Q o local de inserção do quencher.

A expressão de cada RNAm foi normalizada em relação à expressão do gene glucuronidase beta (GUSB) (Applied Biosystems, cod. 433767F). A linhagem celular KG1 foi utilizada como calibrador e controle positivo. As amplificações foram realizadas em volume final de 12,5µL. A preparação da mistura foi realizada utilizando: 50ng/µL de cDNA, 2 x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, cod. 4304437), 0,3µM de senso e antissenso, 0,15µM de sonda. A reação foi submetida aos ciclos de amplificação: 50°C por 20 segundos; 95°C por 10 minutos; 45 ciclos de 95°C por 15 segundos/ 60°C por 1 minuto no equipamento FAST 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os ensaios foram realizados em duplicata no valor de ciclo limiar (CT) para assegurar mínima variação. Em todos os ensaios, utilizou-se um controle positivo e um controle negativo de amplificação contendo apenas água DEPC.

A quantificação relativa foi realizada usando o Método do CT Comparativo ($\Delta\Delta CT$) usando a seguinte fórmula:

$$\Delta CT = CT (\text{alvo}) - CT (\text{gene de referência})$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{amostra}) - \Delta CT (\text{calibrador})$$

O número de vezes em que ocorre a mudança da expressão gênica é calculado como $2^{-\Delta\Delta CT}$ conforme descrito por Livak⁹¹.

3.6.5 Análise Estatística

Para a análise estatística das fases do ciclo celular (G_0/G_1 ; G_2M ; S) nos linfócitos TCD4+ e linfócitos TCD8+, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, comparando-se os grupos controle (CT), portador assintomático HTLV-1 e ATL.

A análise estatística utilizada para o índice de DNA ploidia nos linfócitos TCD4+ e linfócitos TCD8+ foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, comparando-se portador assintomático HTLV-1 e ATL.

Para a associação das fases do ciclo celular com a expressão da hSecurina nos linfócitos TCD4+ e linfócitos TCD8+, utilizou-se o teste de correlação não paramétrico de Sperman. A expressão da hSecurina nos linfócitos TCD4+ e TCD8+ em relação à presença ou não de aneuploidia entre portador assintomático HTLV-1 e ATL foi realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney.

As análises acima foram consideradas estatisticamente significativas quando o nível de significância α igual a 5% e o valor de $p < 0,05$. Para os cálculos, foi utilizado o *software* SPSS for Windows – release 14 evaluation version – SPSS Inc.

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Casuística

Foram avaliados 35 indivíduos saudáveis (CT), 38 portadores assintomáticos do HTLV-1 e 20 casos de leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL).

Os indivíduos do grupo CT tiveram variações na idade de 24 a 80 anos (mediana de 50,0 anos), sendo 19(54,3%) do sexo feminino. A idade dos indivíduos do grupo HTLV-1 variou de 33 a 80 anos (mediana de 55,5 anos), sendo 24 (63,2%) do sexo feminino. No grupo ATL, a idade variou de 24 a 72 anos (mediana de 53,5 anos) (Tabela 5).

Tabela 5 – Características demográficas da população estudada

Características	CT	HTLV-1	ATL	<i>p</i>
Idade (anos)				
mediana	50	55,5	53,5	0,269*
mínima	24	33	24	
máxima	80	80	72	
dp	12,8	11,3	13	
Gênero %				
Feminino	54,3	63,2	50	0,568**
Masculino	45,7	36,8	50	
Total (n)	35	38	20	

dp: desvio padrão; n: número de amostras; * teste de Kruskal-Wallis; ** teste exato de Fisher; diferenças consideradas estatisticamente significantes se $p < 0,05$

Analizamos a expressão do gene hSecurina em 83/100% amostras compostas por 25 CT com mediana de idade de 50,0 anos, sendo 15 do sexo feminino. A maioria de 38(45,8%) do grupo HTLV-1 era do sexo feminino (63,3%), com idade

de mediana de 55,5 anos, enquanto 20 (24,1%) ATL a mediana de idade foi 53,5 anos, sendo 10 (50%) do sexo feminino (Tabela 6).

Tabela 6 – Características demográficas da população estudada para hSecurina

Características	CT	HTLV-1	ATL	p
Idade (anos)				
mediana	50,0	55,5	53,5	0,213*
mínimo	24	33	24	
máximo	80	80	72	
dp	14,1	11,3	13	
Gênero%				
Feminino	60	63	50	0,653**
Masculino	40	37	50	
Total (n)	25	38	20	

dp: desvio padrão; n: número de amostras; * teste de Kruskal-Wallis; ** teste exato de Fisher; diferenças consideradas estatisticamente significantes se $p < 0,05$

No grupo de ATL, quatro (15,8%) foram classificados em forma aguda, seis (31,6%) crônica, cinco (26,3%) linfomatosa e cinco (26,3%) de *smoldering* (Figura 14).

Figura 14 – Distribuição das formas clínicas da ATL segundo Shimoyama (1991).

4.2 DNA ploidia

O estudo das diferentes fases do ciclo celular em linfócitos TCD4+ para o grupo CT demonstrou mediana do número de células em G₀/G₁ de 97,14% e de 98,32% no grupo HTLV-1 assintomático, com diferença estatisticamente significativa (p=0,041). Em ATL, esta mediana foi de 97,25%, mostrando-se significativamente inferior ao grupo HTLV-1, (p=0,023). Isso não foi observado entre o grupo ATL e CT (p=0,575).

Quando estudamos a mediana do número de células nas fases G₂M em linfócitos TCD4+, não houve diferença estatística entre os grupos avaliados (p=0,960) (Tabela 7).

O número de células na fase “S” em linfócitos TCD4+ no grupo ATL apresentou significativo aumento (mediana de 1,80) quando comparado ao grupo CT (mediana de 0,63), p=0,020. A mediana do número de células em fase “S” foi significante inferior em HTLV-1 (mediana de 0,34) em relação ao grupo ATL (mediana 1,80), p< 0,001. O grupo HTLV-1 não apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada ao grupo CT (p=0,073).

Tabela 7 – Proporção de células encontradas nas fases do ciclo celular TCD4+

G₀/G₁	n	mediana	dp	min	máx	<i>p</i>
CT	35	97,1	3,0	86,9	100	0,035*
HTLV-1	38	98,3	2,2	93,0	100	
ATL	20	97,3	3,6	89,6	100	
G₂M						
CT	35	0,6	2,9	0,0	13,1	0,960
HTLV-1	38	0,9	1,8	0,0	7,0	
ATL	20	1,0	2,8	0,0	10,4	
S						
CT	35	0,6	1,8	0,0	7,6	0,003**
HTLV-1	38	0,3	1,2	0,0	7,0	
ATL	20	1,8	3,4	0,0	10,4	

n=número amostras; dp=desvio padrão; min=mínimo; máx=máximo;

*HTLV-1 aumento no número de células em G₀/G₁;

** ATL aumento número de células na fase S

O número de células nas fases G₀/G₁ em linfócitos TCD8⁺ revelou mediana de 97,85% para CT, 98,34% HTLV-1 e 97,41% ATL, respectivamente, sem diferença estatisticamente significativa (p=0,138).

Em linfócitos TCD8⁺ na fase G₂M, observamos a porcentagem em mediana de células respectivamente de CT (0,95), HTLV-1(0,83) e ATL (0,83), sem diferença estatística (p=0,374).

O grupo ATL apresentou maior número de células na fase “S” (mediana 1,54) em linfócitos TCD8⁺ quando comparado ao grupo HTLV-1 (mediana 0,45) (p=0,003) (tabela 8) e ao CT (mediana 0,41) (p=0,001). O estudo da fase “S” demonstrou que o HTLV-1 não foi estatisticamente diferente em comparação ao CT (p=0,712).

Tabela 8 – Proporção de células em TCD8⁺ nas fases do ciclo celular

G ₀ /G ₁	n	mediana	dp	min	máx	<i>p</i>
CT	35	97,9	2,0	91,5	100	0,138
HTLV-1	38	98,3	1,2	94,0	100	
ATL	20	97,4	1,9	92,8	100	
G₂M						
CT	35	1,0	1,9	0	8,5	0,374
HTLV-1	38	0,8	1,2	0	5,5	
ATL	20	0,8	1,1	0	3,3	
S						
CT	35	0,4	1,3	0	6,9	0,003*
HTLV-1	38	0,5	0,9	0	3,7	
ATL	20	1,5	1,7	0	6,1	

n=número amostras; dp=desvio padrão; min=mínimo; máx=máximo;

* Aumento do número de células na fase S em ATL

O cálculo da mediana do IDNA em linfócitos TCD4⁺ demonstrou um aumento significativo em ATL (mediana de 1,02 e desvio padrão de 0,467) em relação ao HTLV-1 (mediana de 1,00 e desvio padrão de 0,070) (p=0,014). A análise do IDNA em sete (36,8%) indivíduos do grupo ATL revelou hiperploidia (>1,05) em linfócitos

TCD4+ (Figura 15), enquanto dois (10,5%) ATL demonstraram valores hiperdiploides em linfócitos TCD8+ (Figura 16).

Figura 15 – Resultado demonstrando histograma de DNAploidia evidenciando presença de pico aneuploide (hiperdiploide) (seta) em linfócitos TCD4+ em ATL.

Figura 16 - Resultado demonstrando em histograma de DNAploidia evidenciando presença de pico aneuploide (hiperdiploide) (seta) em linfócitos TCD8+ em ATL.

O IDNA em linfócitos TCD4+ no grupo HTLV-1 (n=38) demonstrou 15/38 (39,5%) aneuploides, sendo 21,1% hipodiploide ($< 0,95$) e 18,4% hiperploide ($>$

1,05). Em 8/19 ATL, houve IDNA, 42,1% foram aneuploides (5,3% < 0,95 e 36,8% > 1,05) ($p=0,166$) (Figura 16). No grupo CT, todos foram diploides.

O IDNA em linfócitos TCD8+ no grupo HTLV-1 apresentou mediana de 1,00 e em ATL de 0,99 ($p=0,263$).

O estudo do IDNA em linfócitos TCD8+ demonstrou 23,7% aneuploidia (5,3% IDNA >1,05 e 18,4% < 0,95) dos casos no grupo HTLV-1 e 21% aneuploidia (10,5% > 1,05 e 10,5% < 0,95) em ATL ($p=0,603$) (Figura 17).

Quando se comparou IDNA de linfócitos TCD4+ e TCD8+ entre os grupos HTLV-1 ($p=0,854$) e ATL ($p=0,052$), não houve diferença estatística.

Figura 17 - Porcentagem do IDNA diploide e aneuploide em linfócitos TCD4+ e TCD8+. A comparação entre os grupos não revelou diferença estatística em linfócitos TCD4+ ($p=0,166$) e linfócitos TCD8+ ($p=0,603$).

4.3 Expressão do gene hSecurina

Os valores de mediana da quantificação relativa da hSecurina em linfócitos TCD4+ revelou hiperexpressão hSecurina em ATL (0,247) quando comparado ao

grupo HTLV-1 (0,115) e CT (0,107) ($p=0,007$). Isso foi observado em linfócitos TCD8+ com hiperexpressão de hSecurina no grupo ATL (mediana 0,507) em comparação aos grupos CT (0,096) e HTLV-1(0,106) ($p<0,001$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Valores encontrados da expressão hSecurina em linfócitos TCD4+ e TCD8+

hSecurina	CT	HTLV-1	ATL	p
Linfócitos TCD4+				
mediana	0,107	0,115	0,247	0,007*
mínimo	0,019	0,010	0,015	
máximo	0,929	0,662	1,073	
dp	0,254	0,153	0,330	
Linfócitos TCD8+				
mediana	0,096	0,106	0,507	<0,001**
mínimo	0,022	0,019	0,018	
máximo	0,291	0,909	1,392	
dp	0,083	0,178	0,347	
Total (n)	30,1 (25)	45,8(38)	24,1 (20)	

dp: desvio padrão; n: número amostras; * ATL hiperexpressão hSecurina em TCD4+

** ATL hiperexpressão hSecurina em TCD8+

Houve aumento significativo da expressão de hSecurina em TCD4+ nos casos de ATL diploides (mediana=0,311) e aneuploides (mediana=0,213) quando comparados aos HTLV-1 diploides (0,117) e aneuploides (0,080), respectivamente ($p=0,008$) ($p=0,042$). O mesmo foi observado em linfócitos TCD8+ nos casos ATL diploides (mediana=0,507) e aneuploides (mediana=0,602) quando comparados aos HTLV-1 diploides (0,111) e aneuploides (0,076) ($p=0,006$) ($p=0,014$) (Figura 18).

Figura 18 – O gráfico representa a mediana da expressão de hSecurina em linfócitos TCD4+ e TCD8+ de acordo com os grupos. Observa-se, nos casos de ATLL, hiperexpressão de hSecurina nos casos TCD4+ diploide ($p=0,008$) e aneuploide ($p=0,042$), e em ATLL TCD8+ diploide ($p=0,006$) e aneuploide ($p=0,014$), respectivamente.

Não houve diferença estatística na mediana da expressão hSecurina em linfócitos TCD4+ ($p=0,853$) ou TCD8+ ($p=0,340$) nas diferentes formas clínicas de ATL (Tabela 10).

Tabela 10 – Valores da expressão hSecurina em comparação IDNA TCD4+ e TCD8+

	HTLV-1			ATLL			
	N	Mediana	dp	N	Mediana	dp	<i>p</i>
Linfócitos							
<u>TCD4+</u>							
diploide	21	0,12	0,15	11	0,31	0,32	0,008*
aneuploide	14	0,08	0,17	4	0,65	0,43	0,042*
aguda				4	0,21	0,36	0,853**
crônica				6	0,35	0,32	
linfomatosa				5	0,31	0,42	
smoldering				5	0,20	0,34	
Linfócitos							
<u>TCD8+</u>							
diploide	29	0,11	0,19	14	0,51	0,36	0,006*
aneuploide	7	0,08	0,07	3	0,60	0,34	0,014*
aguda				4	0,65	0,19	0,34**
crônica				5	0,30	0,22	
linfomatosa				5	0,26	0,54	
smoldering				4	0,28	0,30	

N- número de pacientes; DP - desvio padrão; * teste Mann-Whitney; ** teste Kruskai-Wallis

4.3.1 Correlação de hSecurina e ciclo celular

Não foi observada correlação entre expressão de hSecurina e a porcentagem de células nas fases G_0/G_1 em linfócitos TCD4+ entre os grupos CT, HTLV-1 e ATL, $p=0,535$ e $p=0,412$ e $p=0,749$, respectivamente. Entretanto, nos subgrupos HTLV-1 e ATL, observou-se correlação inversamente proporcional entre a porcentagem de células em G_0/G_1 e expressão de hSecurina $p=0,018$ e $p=0,040$, respectivamente (Figura 19).

Houve correlação significativa entre o número de células em G_0/G_1 e expressão hSecurina em linfócitos TCD8+ no grupo ATL quando comparado aos grupos CT ($p=0,012$) e HTLV-1 ($p=0,027$). No subgrupo ATL em linfócitos TCD8+, foi observada correlação inversamente proporcional entre o número de células em G_0/G_1 e expressão hSecurina ($p=0,003$) (Figura 19).

Figura 19 – Gráfico da correlação entre o número de células em G_0/G_1 e expressão hSecurina em linfócitos TCD4+ e TCD8+. Os subgrupos HTLV-1 ($p=0,018$) e ATL ($p=0,040$) revelaram correlações inversamente proporcionais entre o número de células em G_0/G_1 e expressão hSecurina em linfócitos TCD4+. Houve uma correlação significativa entre o número de células em G_0/G_1 e expressão hSecurina em linfócitos TCD8+ no grupo ATL quando comparado entre CT ($p=0,012$) e HTLV-1 ($p=0,027$). No subgrupo ATL em linfócitos TCD8+, foi observada uma correlação inversamente proporcional entre o número de células em G_0/G_1 e expressão hSecurina ($p=0,003$).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre expressão de hSecurina e número de células em fase G2/M em linfócitos TCD4+ entre os grupos CT, HTLV-1 ($p=0,928$) e ATL ($p=0,803$). O mesmo foi observado em linfócitos T CD8+ entre os grupos CT, HTLV-1 ($p=0,697$) e ATLL ($p=0,576$).

Em relação ao número de células na fase “S” e a expressão da hSecurina em linfócitos TCD4+, não houve diferença significativa entre os grupos CT e HTLV-1 ($p=0,134$) ou ATL ($0,529$). Porém, no subgrupo HTLV-1, observamos correlação positiva e estatisticamente significativa entre o número de células em fase “S” e a expressão de hSecurina ($p=0,001$) (Figura 20).

No grupo ATL, uma correlação significativa entre o número de célula na fase “S” e a expressão de hSecurina em linfócitos TCD8+ quando comparados ao CT ($p=0,004$) e HTLV-1 ($p=0,003$). No subgrupo ATL, foi observada correlação positiva entre o número de célula na fase “S” e a expressão de hSecurina ($p=0,001$) (Figura 20).

Figura 20 – Gráfico de correlação entre o número de células em fase “S” e expressão hSecurina em linfócitos TCD4+ e TCD8+. Não houve correlações significativas em TCD4+ entre os grupos. No subgrupo HTLV-1 ($p=0,001$), houve correlação positiva entre o número de células em fase “S” e expressão hSecurina. Em linfócitos TCD8+, foi observada, no grupo ATL, uma correlação significativa entre o número de células em fase “S” e expressão hSecurina em comparação ao CT ($p=0,004$) e HTLV-1 ($p=0,003$). O subgrupo ATL revelou uma correlação positiva entre o número de células em fase “S” e expressão hSecurina ($p=0,001$).

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, observamos atraso do ciclo celular em linfócitos T CD4+ na fase G₀/G₁ em portadores assintomáticos do HTLV-1 com diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo-controle (p=0,041) e ATLL (p=0,023). Observamos, ainda, que os portadores assintomáticos apresentaram aneuploidia em linfócitos e correlação inversamente proporcional entre porcentagem células em G₀/G₁ e expressão do gene hsecurina em linfócitos T CD4+.

Apesar de não termos avaliado a expressão da Tax em nosso estudo, nós hipotetizamos que estas anormalidades do ciclo celular encontradas nos portadores do HTLV-1, provavelmente, estão associadas à ação desta proteína. Nossa hipótese ancora-se em resultados prévios nos quais se demonstrou que a Tax ativa a transcrição de genes chaves no controle do ciclo celular, podendo causar desregulação da proliferação e transformação neoplásica⁹². A ação da Tax ocorre, especialmente, nos estágios iniciais da proliferação celular e na desregulação de genes supressores tumorais, promovendo inativação dos mecanismos de checagem (*checkpoints*) do ciclo celular, impedindo a correção de eventos indesejáveis que possam ocorrer durante a divisão celular⁹³.

Os resultados de nosso estudo foram consistentes com diferentes grupos que descreveram atraso no ciclo celular (Arainga *et al.*, 2012) por ação da Tax em células HeLa infectadas pelo HTLV-1⁹⁴. Utilizando a técnica de citometria de fluxo, este estudo revelou atraso do ciclo celular durante a fase G₁ e subsequente indução de apoptose. Liu M e colaboradores (2008) também analisaram os efeitos biológicos da infecção pelo HTLV-1 em células HeLa, de osteossarcoma humano (HOS) e em linfoblastos T (SupT1)⁹⁵. As HeLa e SupT1 infectadas pelo HTLV-1 apresentaram altos níveis das proteínas p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}, anormalidades mitóticas e atraso em G₁ em senescência. O mesmo não foi constatado em células HOS infectadas pelo HTLV-1, nas quais se observou drástica redução de ambos, p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}, sem prejuízo da divisão celular. A redução de p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}, nestas células, foi associada a ativação das vias de sinalização da fosfatidilinositol-3-quinase

(p13K) e da proteína quinase B (Akt)⁹⁵. Posteriormente, Fukuda e colaboradores (2012) demonstraram hiperativação da via p13K secundários à ação da Tax em ATL^{96,97}. Da mesma forma, Kuo e Giam (2006) demonstraram que esta proteína viral induziu rápida senescência celular em consequência da ativação do APC de forma independente dos genes supressores tumorais p53 e pRB em células HeLa infectadas pelo HTLV-1⁹⁸. Consequentemente, houve atraso do ciclo celular em G₁ e hiperexpressão da quinase dependente de ciclina 2 (Cdk2), que possui função inibitória de p21^{CIP1/WAF1} e p27^{KIP1}.

Outros autores também encontraram atraso em G₀/G₁ do ciclo celular em células infectadas pelo HTLV-1⁹⁹. Porém, diferente do nosso estudo, Sibon e colaboradores (2006) avaliaram células TCD4+ transformadas *in vitro* pelo HTLV-1. Entretanto, nós avaliamos células TCD4+ e TCD8+ obtidas do sangue periférico de portadores assintomáticos do HTLV-1¹⁰⁰. É possível que o atraso do ciclo celular nos linfócitos T CD4+ observada em nosso estudo tenha sido relacionada à hipoeexpressão do gene hSecurina dado que encontramos relação inversamente proporcional entre a porcentagem de linfócitos T CD4 em G₀/G₁ e a expressão deste gene (p=0,018). Nós hipotetizamos que a hipoeexpressão do gene hSecurina poderia estar relacionada com os efeitos da instabilidade genômica por ação da Tax no ciclo celular. Corroborando esta hipótese, estudos prévios demonstraram redução nos níveis de hSecurina em *Saccharomyces cerevisiae* e linhagens celulares por ação da Tax¹⁰¹. Similares reduções de hSecurina associadas à expressão da Tax também foram evidenciadas em camundongos¹⁰². A Tax pode interferir com o complexo/ciclossomo promotor de anáfase (APC/C) produzindo instabilidade cromossômica por ação direta sobre a hSecurina^{103,104}.

Em contraste com nossas observações em que encontramos redução de hSecurina e atraso do ciclo celular em G₀/G₁, outro estudo demonstrou que a hipoeexpressão de hSecurina tem pouco ou nenhum efeito na segregação cromossômica em células humanas. Observaram em linhagem de câncer de cólon humano (HCT116) que, mesmo na ausência de hSecurina, havia atividade de separase suficiente para executar a anáfase normalmente¹⁰⁵.

Quando avaliamos as fases G₀/G₁ de linfócitos T CD8+, não observamos diferenças significativas entre os grupos (p=0,138). Este resultado não foi

surpreendente, pois a célula maligna em ATL, usualmente, possui fenótipo T CD4+. Desta forma, é provável que o papel do T CD8+ nesta doença esteja relacionado com mecanismos reacionais. A infecção por HTLV-1 desencadeia resposta imune que induz produção de anticorpos específicos anti-HTLV-1, que podem conferir proteção antiviral¹⁰⁶. Porém, indivíduos HTLV-1 positivos com determinados antígenos leucocitários humanos (HLA) Classe 1 não conseguem apresentar resposta imune anti-HTLV-1 e, portanto, são incapazes de reconhecer as proteínas virais¹⁰⁷. Por outro lado, a supressão do gene da Tax por fatores não imunológicos ou virais silenciam sua transcrição, contribuindo para a ausência de resposta imune celular do hospedeiro contra as células infectadas¹⁰⁸. Yashiki e colaboradores demonstraram que indivíduos com genótipos HLA-A*26, HLA-B*4002, HLA-B*4006, HLA-B*4801 tem maior predisposição para desenvolver ATL¹⁰⁹. Outro estudo (2011) propôs uma hipótese baseada em modelo tridimensional matemático para explicar a relação entre latência proviral do HTLV-1 e ativação de populações celulares. Neste estudo, foram usados métodos experimentais e teóricos de cinética de células TCD4+ de trabalhos anteriores^{110, 111}. Os autores observaram relação entre equilíbrio da latência da infecção e resposta imune¹¹².

Em nosso estudo, também evidenciamos correlação diretamente proporcional e significativa entre porcentagem de células na fase S e expressão de hSecurina em linfócitos T CD4+ em portadores assintomáticos ($p=0,001$). Entretanto, não houve correlação entre expressão de hSecurina e fase S quando nos grupos CT, e HTLV-1 ($p=0,134$) e ATL (0,529).

O efeito da hSecurina na proliferação celular ainda é controverso. Alguns estudos observaram que a hSecurina reduz a proliferação celular por atraso na mitose e inibição da separação das cromátides irmãs. Por outro lado, sua ação como oncogene está relacionada a seu efeito pró-proliferativo¹¹³. Filippella e colaboradores (2006) demonstraram correlação entre hSecurina e proliferação em adenomas pituitários¹¹⁴. Da mesma forma, a expressão de hSecurina tem sido utilizada como marcador de atividade proliferativa em câncer de pele¹¹⁵ e mama¹¹⁶.

Conhecidos marcadores de atividade proliferativa como o antígeno Ki67 e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) são usualmente expressos nas fases

S e G₂/M¹¹⁷. Em contraste, a estes marcadores, a expressão da hSecurina ocorre de forma gradual durante a fase S com pico em G₂/M^{118,119}.

Como esperado, observamos significantes anormalidades do ciclo celular na fase S em ATL quando comparados ao grupo CT (p=0,020) e HTLV-1 (p<0,001). Concomitantemente, encontramos hiperexpressão do gene hSecurina em linfócitos TCD4+ em ATL. De forma semelhante, a hiperexpressão do oncogene hSecurina em células tumorais também foi encontrada em ATL por outros autores^{120,121}. O mRNA da hSecurina tem sido isolado de outras células tumorais, a exemplo de células Jurkat (células de linhagem T humana) e de amostras de pacientes com diferentes tipos de neoplasias hematológicas e síndromes mielodisplásicas. Em contraste, essa expressão foi relativamente baixa ou indetectável em amostras de indivíduos saudáveis¹²².

Segundo Hagting e colaboradores (2002), a hSecurina tem importante papel na regulação dos pontos de checagem (*checkpoint*) do ciclo celular¹²³. Sua hiperexpressão pode promover instabilidade genômica ao inibir prematuramente a separação das cromátides irmãs¹²⁴. Desta forma, sua hiperexpressão pode causar transformação celular e aneuploidia. Também contribui para atraso da metáfase pela inibição da separase, impedindo a degradação das coesinas e a consequente separação das cromátides irmãs^{125,126}. Outros estudos evidenciaram que a perda de reguladores mitóticos por ação da Tax pode promover atraso na progressão do ciclo celular, surgimento de aneuploidia e formação de células multinucleadas em portadores do HTLV-1¹²⁷. Entretanto, outros estudos sugerem que a expressão da Tax não é suficiente para promover a transformação da célula maligna na ATL. Possivelmente, outras alterações genéticas promovidas por outros oncogenes como o HBZ sejam necessárias para causar esta neoplasia^{128, 129}.

O desenvolvimento de aneuploidia foi relatado em células tumorais associadas a alterações de expressão de proteínas envolvidas na segregação cromossômica e no fuso mitótico¹³⁰. As proteínas serina/treonina quinase Aurora também estão associadas aos processos de segregação cromossômica^{131, 132}. A correta segregação dos cromossomos é assegurada durante a proliferação celular normal por centrossomos por meio da organização do fuso mitótico bipolar dependente da atividade da Aurora A^{133,134}. A aurora B desempenha importante papel no

alinhamento e na orientação dos cromossomos, ativação do ponto de checagem mitótico e na citocinese por meio da survivina e das proteínas centroméricas¹³⁵. Estudos com linhagem celular de HTLV-1 e ATL evidenciaram aumento da expressão da Aurora A com redução da viabilidade e indução da apoptose¹³⁶.

Não encontramos diferenças de expressão de hSecurina nas fases G₂M em linfócitos TCD4+ (p=0,960) e TCD8+ (p=0,374) em indivíduos saudáveis ou nos grupos HTLV-1 e ATL.

Apesar das diferenças metodológicas entre nosso estudo e os realizados por Sibon e colaboradores, não evidenciamos expansão clonal com divisão celular anormal e aumento da porcentagem de células nas fases G₂M e S do ciclo celular em linfócitos TCD4+ HTLV-1 positivos¹⁰⁰. Talvez estas diferenças tenham ocorrido pelo fato de termos analisado linfócitos T CD4 e T CD8 individualmente, enquanto Sibon e colaboradores avaliaram linfócitos totais em portadores de HAM/TSP. Outro estudo demonstrou relação entre expressão de p30 do HTLV-1 e a progressão do ciclo celular em células HeLa, resultando em atraso da fase S e redução das ciclinas E-CDK2¹²⁸.

Neste estudo, encontramos resultados surpreendentes e significativos de anormalidades do ciclo celular em linfócitos TCD4+ e expressão do gene hSecurina em portadores do HTLV-1 *in vivo*. Inicialmente, hipotetizamos que anormalidades do ciclo celular de linfócitos TCD4+ de portadores de HTLV-1 poderiam ocorrer em um ambiente de instabilidade genética decorrentes de anormalidades de expressão do gene hSecurina. Nós sugerimos que a presença destas anormalidades genéticas observadas em portadores do HTLV-1, se confirmadas em estudos futuros, pode vir a ser um marcador de progressão para ATL.

6 Conclusão

6 CONCLUSÃO

1. Pacientes com ATL apresentaram um aumento da expressão do gene hSecurina nos linfócitos TCD4+ e TCD8+ em relação aos grupos HTLV-1 e CT;
2. Não observamos diferença de expressão de hSecurina nos linfócitos TCD4+ e TCD8+ nas diferentes formas clínicas de ATL;
3. Não foi observado correlação entre a expressão relativa de hSecurina e IDNA nos linfócitos TCD4+ e TCD8+ entre os grupos HTLV-1 e ATL;
4. O grupo HTLV-1 apresentou um aumento na porcentagem de células TCD4+ na fase G₀/G₁ em comparação aos casos de ATL e CT;
5. O grupo ATL apresentou um aumento na porcentagem de células TCD4+ e TCD8+ na fase “S” em comparação aos casos de HTLV-1 e CT;
6. Não houve diferença estatística do número de células nas fases G₂M nos linfócitos TCD4+ e TCD8+ entre os grupos avaliados;
7. Observou-se um aumento da expressão do gene hSecurina nos linfócitos TCD4+ e TCD8+ no grupo ATL (células diplóides e aneuploides) quando comparados ao grupo HTLV-1;
8. Nos grupos HTLV-1 e ATL, observou-se correlação inversa entre a porcentagem de células em G₀/G₁ e expressão de hSecurina nos linfócitos TCD4+;
9. No grupo ATL, houve correlação inversa entre a porcentagem de células em G₀/G₁ e expressão de hSecurina nos linfócitos TCD8+;

10. No grupo HTLV-1, observamos correlação positiva entre a porcentagem de células na fase “S” e a expressão de hSecurina nos linfócitos TCD4+;
11. No grupo ATL, houve correlação positiva entre a porcentagem de células na fase “S” e expressão de hSecurina nos linfócitos TCD8+;
12. Nos grupos estudados não observamos correlação entre a expressão de hSecurina e a porcentagem de células na fase G2M nos linfócitos TCD4+ e TCD8+.

7 ANEXOS

7.1 Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL (Instrução para preenchimento no verso)

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐ DATA

NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:.....Nº: APTO:

BAIRRO:.....CIDADE

CEP:.....TELEFONE: DDD(.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐ DATA

NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO:.....Nº.....APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:

CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Estudo da expressão do gene hSecurina e quantificação do índice de DNA em portadores assintomáticos do vírus linfotrópico T humano tipo 1 e em pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto.**

2. PESQUISADOR: Dra. Juliana Pereira

CARGO/FUNÇÃO: Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: CRM 73746

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Hematologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

- 1 – O objetivo deste estudo é identificar a expressão de um gene chamado hSecurina, responsável pela divisão correta das células. Queremos saber se este gene está envolvido no aparecimento da Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATL) causada pelo vírus HTLV-1. Neste estudo queremos avaliar se este gene está sendo muito produzido ou pouco produzido em quem tem este vírus e não têm a doença e nas pessoas que têm a leucemia. Vamos também estudar este gene no sangue de pessoas que não têm o vírus para que sirvam de comparação com os que têm o vírus, deste jeito vamos saber se o gene da securina está aumentado ou diminuído em relação às pessoas que não têm o vírus.
- 2 – Os testes serão realizados por exames minuciosos de Biologia Molecular e de imunologia por Citometria de Fluxo e os resultados serão comparados com os da literatura;
- 3 – Serão colhidos 7 tubos de sangue contendo anticoagulante em veia do antebraço;
- 4 – No momento da coleta do sangue você poderá sentir dor local suportável e, ocasionalmente o local poderá ficar arroxado devido à formação dos hematomas;
- 5 – Este estudo não vai trazer benefício direto para você, pois é um estudo que não vai ser aplicado neste momento, pois estamos verificando a hipótese de que o gene Securina alterado pode colaborar para o aparecimento das anormalidades celulares encontradas nos pacientes com ATL e nos portadores do vírus HTLV-1 sem manifestação da doença. Somente no final do estudo poderemos concluir se haverá benefício para a população estudada ou se este teste poderá ser utilizado como marcador de progressão do estado de portador do vírus HTLV-I para o de doente;
- 6 – **Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos qual o paciente pode optar;**
- 7 – Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra Juliana Pereira, que pode ser encontrada na Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155 – 1º andar – sala: 61. Telefone: 3061-5544 ramal: 339. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-

6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

- 8 – Você tem liberdade de retirar este consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento aqui nesta Instituição;
- 09 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado à identificação de nenhum paciente;
- 10 – Você tem direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 11 – Não existem 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;
- 12 – Em caso de dano pessoal diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.
- 13 – Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo: **Estudo da expressão do gene hsecurina e quantificação do índice de DNA em portadores assintomáticos do vírus linfotrópico T humano tipo 1 e em pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto.**

Eu discuti com a Dra. Juliana Pereira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de 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

_____/_____/_____
Assinatura da testemunha Data

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

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

_____/_____/_____
Assinatura do responsável pelo estudo Data

7.2 Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL (Instrução para preenchimento no verso)

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐ DATA

NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD(.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M ☐ F ☐ DATA

NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº: APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD(.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Estudo da expressão do gene hSecurina e quantificação do índice de DNA em portadores assintomáticos do vírus linfotrópico T humano tipo 1 e em pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto.**

2. PESQUISADOR: Dra. Juliana Pereira

CARGO/FUNÇÃO: Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: CRM 73746

UNIDADE DO HCFMUSP: Serviço de Hematologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses

- 1 – O (a) Sr(a) está convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é identificar a expressão de um gene chamado hSecurina, responsável pela divisão correta das células. Queremos saber se este gene está envolvido no aparecimento da Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto causada pelo vírus HTLV-1. Vamos estudar este gene no sangue de pessoas que não possuem o vírus para que sirvam de comparação com os que têm o vírus, deste jeito vamos saber se o gene hSecurina está aumentado ou diminuído em relação às pessoas que não têm o vírus.
- 2 – Os testes serão realizados por exames minuciosos de Biologia Molecular e de Citometria de Fluxo e os resultados serão comparados com os da literatura.
- 3 – Serão coletados cinco tubos a vácuo com traços de heparina sódica por punção venosa em antebraço. Após a coleta o (a) Sr(a) deverá pressionar o local com algodão para evitar o aparecimento de mancha roxa. Necessitamos também de suas informações cadastrais como idade, sexo e provas sorológicas a fim de parearmos com os nossos pacientes.
- 4 – No momento da coleta do sangue você poderá sentir dor local suportável e, ocasionalmente o local poderá ficar arroxado devido à formação dos hematomas.
- 5 – O (a) Sr(a) ajudará no desenvolvimento de um exame diagnóstico mas, somente no final do estudo poderemos concluir a presença de algum benefício.
- 6 – Não existe a necessidade de optar por um procedimento alternativo, decorrente da simplicidade do procedimento utilizado.
- 7 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a Dra. Juliana Pereira, que pode ser encontrado no endereço: Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 1º andar, sala 61, bloco 4, tel.: (11) 3061-5544 ramal 339. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br
- 8 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.
- 9 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros controles saudáveis, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante;

- 10 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 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.
- 12 - Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo:

Estudo da expressão do gene hSecurina e quantificação do índice de DNA em portadores assintomáticos do vírus linfotrópico T humano tipo 1 e em pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto.

Eu discuti com a Dra Juliana Pereira sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de 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

_____/_____/_____
Assinatura da testemunha Data

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

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

_____/_____/_____
Assinatura do responsável pelo estudo Data

7.3 Anexo C – Dados clínicos e epidemiológicos pacientes Leucemia T do Adulto

N	Idade	Sexo	Leuc. mm ³	Linf. %	HB g/dL	HT %	DHL U/L	Ca mg/dL	Elisa	W. blot	Inf. cutânea	Linfadenopatia	Lesões ósseas	MO infiltrada	Apres. Leucêmica
1	34	F	80.500	35,7	12,0	36	693	9,0	R	R	Não	Não	Não	Não	Não
2	44	M	7.500	19,9	6,7	24	13.452	12,0	R	R	Não	Não	Não	Não	Não
3	61	F	6.800	48,1	14,0	41	1.161	10,0	R	R	Não	Sim	Não	Não	Não
4	48	M	3.800	47,9	16,0	47	407	9,7	R	R	Não	Não	Não	Não	Não
5	55	F	9.000	34,2	13,0	39	303	9,2	R	R	Não	Não	Não	Não	Não
6	59	F	5.200	45,4	13,0	39	335	9,3	R	R	Sim	Não	Não	Não	Não
7	68	M	1.900	91,0	7,4	21	533	8,1	R	R	Não	Não	Não	Sim	Não
8	55	F	3.760	38,0	6,4	19	1.002	7,2	R	R	Não	Sim	Não	Não	Sim
9	78	M	11.240	19,9	15,0	45	282	9,3	R	R	Não	Não	Não	Não	Não
10	57	F	15.500	43,0	11,0	34	567	9,1	R	R	Sim	Não	Não	Não	Não
11	36	F	6.060	32,8	13,0	41	874	8,8	R	R	Sim	Não	Não	Não	Não
12	73	M	5.230	18,4	14,0	41	325	8,9	R	R	Não	Não	Não	Não	Não
13	51	F	24.080	35,1	15,0	46	1.562	8,3	R	R	Não	Sim	Não	Não	Não
14	58	M	6.500	22,2	8,5	27	409	4,2	R	R	Não	Não	Não	Não	Não
15	30	M	94.730	26,5	12,0	36	1.667	9,0	R	R	Não	Sim	Não	Sim	Sim
16	55	M	5.580	20,3	16,0	45	303	9,7	R	R	Não	Não	Não	Não	Não
17	67	F	920	71,7	13,0	40	283	8,6	R	R	Sim	Sim	Não	Não	Não
18	57	F	4.430	32,1	13,0	41	339	9,5	R	R	Não	Não	Não	Não	Não
19	47	M	4.000	14,5	10,0	29	1.043	7,0	R	R	Não	Sim	Não	Não	Não
20	62	M	16.910	25,0	11,0	30	>3000	9,1	R	R	Sim	Sim	Não	Não	Não

R: reagente

7.4 Anexo D - Dados clínicos e epidemiológicos portadores assintomáticos HTLV-1

N	Idade	Sexo	Leuc. mm3	Linf. %	HB g/dL	HT %	DHL U/L	Ca mg/dL	β2 mg/mL	Elisa	W.blot
1	51	F	3.200	57,6	11,0	32,5	344	10,0	2,3	R	R
2	43	F	6.300	30,5	14,0	39,8	492	9,0	1,1	R	R
3	42	F	4.400	48,3	10,8	34,9	373	10,0	1,1	R	R
4	70	M	6.400	25,4	13,6	40,7	312	8,0	2,9	R	R
5	49	M	9.800	29,8	14,6	43,3	331	10,0	1,1	R	R
6	37	F	5.500	26,0	13,5	38,3	296	9,0	1,9	R	R
7	57	M	8.500	24,0	13,9	42,2	432	10,0	2,8	R	R
8	60	F	6.200	28,7	13,7	42,4	317	10,0	1,3	R	R
9	57	F	4.100	48,2	12,0	35,5	327	10,0	1,8	R	R
10	57	F	7.800	45,1	13,0	36,7	382	10,0	2,2	R	R
11	43	F	3.200	41,3	12,6	38,2	396	9,0	1,5	R	R
12	51	F	6.100	32,0	14,2	40,6	339	10,0	1,5	R	R
13	38	F	6.800	33,9	12,7	37,7	255	9,0	1,3	R	R
14	59	M	4.800	35,9	15,9	47,6	481	10,0	2,1	R	R
15	51	F	3.400	37,2	12,3	37,7	418	10,0	1,2	R	R
16	55	M	6.700	42,6	13,6	41,0	346	9,0	3,0	R	R
17	50	M	8.900	29,8	14,9	44,0	182	10,0	1,4	R	R
18	52	M	4.800	32,0	14,6	41,9	350	9,0	1,7	R	R
19	56	F	3.800	39,2	13,8	43,0	425	10,0	2,1	R	R
20	56	M	4.200	45,1	12,4	38,2	275	9,0	2,0	R	R
21	77	F	5.300	18,0	13,2	40,1	379	10,0	1,6	R	R
22	53	M	6.900	24,1	16,1	48,4	308	9,0	1,9	R	R
23	62	F	5.600	35,6	14,7	43,1	319	10,0	1,6	R	R
24	50	F	5.200	41,7	14,6	43,7	349	10,0	2,0	R	R
25	46	M	5.400	31,6	14,3	44,5	319	9,0	1,3	R	R
26	42	F	4.500	50,8	12,6	37,2	397	9,0	1,3	R	R
27	39	M	9.200	35,5	14,0	44,6	384	10,0	1,4	R	R
28	33	F	5.200	42,2	15,2	45,6	305	10,0	1,6	R	R
29	59	F	5.200	45,4	13,1	39,2	335	9,0	1,8	R	R
30	58	F	2.400	62,0	13,5	42,0	440	9,0	1,6	R	R
31	54	F	6.400	45,9	12,9	39,2	459	10,0	1,8	R	R
32	67	F	5.500	42,6	14,5	43,2	291	9,0	2,0	R	R
33	80	M	5.500	31,6	14,8	44,2	334	9,0	2,1	R	R
34	40	M	7.700	41,3	15,2	45,2	340	10,0	1,7	R	R
35	42	F	13.800	15,9	13,0	37,5	367	9,0	1,3	R	R
36	67	F	6.800	37,4	11,5	37,4	362	10,0	2,8	R	R
37	77	F	5.210	46,8	14,0	42,4	371	9,0	2,0	R	R
38	65	M	4.300	46,9	14,1	42,3	432	9,0	1,8	R	R

R: reagente

7.5 Anexo E – Resultados de DNAploidia e do gene hSecurina no grupo CT em TCD4+

N	G0/G1	G2/M	S	hSecurina
1	96,9	2,65	0,45	0.0582
2	94,6	5,44	0,00	0.9286
3	100,0	0,00	0,00	0.1244
4	97,3	0,50	2,55	0.1519
5	97,1	0,00	2,86	0.1366
6	95,0	2,90	2,09	0.0860
7	94,6	0,00	5,38	0.0805
8	100,0	0,00	0,00	0.3927
9	88,9	7,82	3,31	0.1002
10	92,8	7,19	0,00	0.0518
11	98,3	1,04	0,64	0.0958
12	99,9	0,00	0,15	0.0188
13	99,2	0,50	0,26	0.0871
14	98,5	1,50	0,00	0.0940
15	97,2	0,00	2,76	0.0827
16	97,8	1,71	0,45	0.1161
17	99,4	0,00	0,56	0.0555
18	98,7	0,76	0,55	0.1068
19	98,6	0,00	1,36	0.0923
20	95,9	0,18	3,95	0.1139
21	94,0	5,76	0,23	0.1308
22	96,8	2,82	0,39	0.7671
23	98,3	0,43	1,24	0.2334
24	92,4	0,00	7,63	0.8544
25	95,0	3,76	1,25	0.1856

7.6 Anexo F - Resultados de DNAploidia e do gene hSecurina no grupo CT em linfócitos TCD8+

N	GO/GI	G2/M	S	hSecurina
1	97,6	1,66	0,70	0.0423
2	94,3	5,69	0,00	0.0436
3	98,1	1,94	0,00	0.0230
4	99,0	0,57	0,38	0.0221
5	99,1	0,53	0,39	0.1880
6	97,2	2,42	0,41	0.2250
7	98,2	1,77	0,00	0.0963
8	98,4	0,63	0,42	0.1270
9	99,1	0,92	0,00	0.0846
10	96,9	3,06	0,00	0.2764
11	98,4	0,75	0,81	0.0815
12	95,0	3,52	1,45	0.1454
13	99,3	0,70	0,00	0.0230
14	97,9	0,95	1,14	0.1460
15	99,4	0,58	0,00	0.1567
16	96,4	2,63	1,00	0.1004
17	97,9	1,20	0,95	0.0764
18	100,0	0,00	0,00	0.2910
19	98,5	0,50	0,95	0.1101
20	97,0	0,00	2,97	0.0411
21	96,7	3,13	0,13	0.0260
22	96,5	2,92	0,59	0.2565
23	99,5	0,55	0,00	0.0370
24	97,3	1,70	0,99	0.0470
25	98,0	0,00	2,03	0.1703

7.7 Anexo G - Resultados de DNAploidia e do gene hSecurina no grupo HTLV-1 em linfócitos TCD4+

N	GO/GI	G2/M	S	ID:CD4+	hSecurina
1	96,1	3,25	0,66	0,93	0.1476
2	93,2	4,22	2,56	1,12	0.0963
3	98,6	0,89	0,58	1,00	0.0104
4	100,0	0,00	0,00	0,93	0.0250
5	96,9	1,96	1,15	1,00	0.1948
6	98,3	0,14	1,55	0,95	0.0682
7	99,4	0,06	0,49	0,99	0.1978
8	97,6	1,79	0,65	0,90	0.2958
9	97,3	2,15	0,54	1,00	0.2049
10	100,0	0,00	0,00	0,88	0.0627
11	98,3	1,68	0,00	1,00	0.5296
12	100,0	0,00	0,00	1,00	*
13	98,1	1,37	0,56	1,06	0.1189
14	100,0	0,00	0,00	1,00	0.0614
15	100,0	0,00	0,00	0,96	*
16	98,4	0,76	0,80	0,99	0.1151
17	100,0	0,00	0,00	1,00	0.0740
18	99,8	0,22	0,00	0,92	*
19	97,2	2,61	0,19	1,06	0.1225
20	98,8	0,87	0,34	1,03	0.1184
21	99,8	0,00	0,18	1,01	0.0169
22	97,4	2,30	0,34	1,12	0.1698
23	98,5	1,07	0,46	1,00	0.1171
24	97,1	2,92	0,00	0,93	0.0524
25	97,2	2,84	0,00	0,97	0.4575
26	93,9	5,90	0,21	1,01	0.0427
27	99,7	0,01	0,33	1,02	0.0857
28	99,5	0,00	0,48	1,03	0.0303
29	99,6	0,07	0,31	1,02	0.0308
30	96,0	3,31	0,66	1,06	0.0475
31	93,1	4,99	1,90	1,03	0.4316
32	97,6	1,76	0,61	1,08	0.0337
33	98,1	0,00	1,90	0,97	0.1587
34	93,0	7,02	0,00	0,74	0.0463
35	93,0	0,00	6,98	0,94	0.6624
36	99,6	0,04	0,34	1,01	0.1711
37	99,2	0,59	0,59	1,10	0.0435
38	95,5	4,23	0,29	0,98	0.2330

* Não avaliado

7.8 Anexo H - Resultados de DNAploidia e do gene hSecurina no grupo HTLV-1 em linfócitos TCD8+

N	GO/GI	G2/M	S	ID:CD8+	hSecurina
1	97,6	1,93	0,44	0,96	0.0785
2	96,3	0,00	3,73	0,64	0.1881
3	97,2	2,22	0,58	1,00	0.9093
4	98,4	0,80	0,78	1,02	0.0872
5	98,1	1,31	0,60	0,93	*
6	97,8	0,00	2,16	0,96	0.0495
7	99,6	0,00	0,38	0,97	0.1669
8	99,0	0,58	0,47	0,88	0.0757
9	98,1	0,64	1,27	1,02	0.0501
10	98,7	0,75	0,51	0,95	0.0412
11	97,2	2,80	0,00	0,90	0.0461
12	99,2	0,81	0,00	1,02	0.0931
13	98,5	1,51	0,00	1,02	0.0494
14	98,5	1,23	0,25	0,99	0.1322
15	97,4	0,10	2,51	0,99	0.1010
16	98,9	0,00	1,14	0,99	0.1608
17	98,6	0,08	1,32	0,95	0.6218
18	99,4	0,13	0,47	0,93	*
19	96,8	3,19	0,00	1,03	0.0816
20	97,4	2,31	0,33	1,04	0.0649
21	99,1	0,89	0,00	0,96	0.4892
22	97,7	1,89	0,38	1,13	0.2233
23	98,5	1,07	0,46	1,00	0.1119
24	96,7	2,71	0,61	0,98	0.0490
25	96,3	0,16	3,50	0,99	0.1226
26	94,0	5,52	0,52	1,01	0.2610
27	98,8	0,85	0,34	1,05	0.0528
28	99,3	0,23	0,44	1,08	0.0655
29	99,4	0,00	0,56	1,01	0.1110
30	97,4	2,18	0,41	0,80	0.0568
31	96,9	2,69	0,43	1,04	0.1555
32	98,3	1,02	0,72	1,00	0.0186
33	97,5	2,29	0,26	0,95	0.2278
34	100,0	0,00	0,00	0,86	0.1816
35	99,4	0,14	0,43	1,02	0.1313
36	100,0	0,00	0,00	1,02	0.0186
37	98,7	0,70	0,56	1,00	0.1254
38	97,1	2,79	0,14	1,00	0.2441

* Não avaliado

7.9 Anexo I - Resultados de DNAploidia e do gene hSecurina no grupo ATL em linfócitos TCD4+

N	Shimoyama	GO/GI	G2/M	S	ID:CD4+	hSecurina
1	crônica	95,9	1,91	2,16	1,13	0.428
2	linfomatosa	96,2	0,00	3,81	1,03	0.311
3	linfomatosa	97,3	1,89	0,87	1,01	0.486
4	crônica	95,5	2,57	1,96	1,05	0.498
5	aguda	89,6	0,00	10,36	1,06	0.872
6	smoldering	95,8	0,89	3,35	1,00	0.015
7	smoldering	98,5	0,00	1,54	1,02	0.446
8	crônica	91,4	7,91	0,69	0,92	1.015
9	crônica	98,1	1,91	0,00	0,98	0.190
10	smoldering	98,3	1,33	0,35	1,00	0.864
11	aguda	98,7	0,67	0,67	1,02	0.1847
12	aguda	97,3	0,78	1,92	1,00	0.2300
13	linfomatosa	*	*	*	*	0.0456
14	linfomatosa	90,0	0,00	9,97	1,01	1,0734
15	crônica	100,1	0,16	1,80	*	0.1620
16	crônica	90,6	*	9,40	*	0.2640
17	linfomatosa	98,3	1,08	0,65	1,07	0.0800
18	smoldering	89,6	10,42	0,00	*	0.1033
19	aguda	97,8	2,22	3,51	*	0.0960
20	smoldering	99,2	0,66	0,12	0,97	0.1983

* Não avaliado

7.10 Anexo J - Resultados de DNAploidia e do gene hSecurina no grupo ATL em linfócitos TCD8+

N	Shimoyama	GO/GI	G2/M	S	ID:CD8+	hSecurina
1	crônica	98,1	3,32	1,26	1,19	0.2827
2	linfomatosa	93,9	0,02	6,05	1,02	1.392
3	linfomatosa	97,7	0,98	1,31	1,04	0.0178
4	crônica	96,8	0,00	3,23	0,99	0.7730
5	aguda	96,8	0,00	3,24	0,98	0.6990
6	smoldering	99,0	0,66	0,31	0,97	0.5090
7	smoldering	98,6	0,00	1,45	1,03	0.6160
8	crônica	97,0	2,65	0,38	0,99	*
9	crônica	99,1	0,90	0,00	0,99	0.5440
10	smoldering	92,8	2,67	4,56	0,94	*
11	aguda	97,4	1,05	1,54	0,98	0.5050
12	aguda	93,8	2,27	3,93	0,88	0.9570
13	linfomatosa	99,0	0,00	1,02	0,98	0.2635
14	linfomatosa	96,5	0,83	2,67	1,01	0.5930
15	crônica	96,5	0,00	3,48	1,05	0.3038
16	crônica	96,0	2,54	3,10	0,97	0.2660
17	linfomatosa	*	*	*	*	0.2570
18	smoldering	98,4	1,23	0,38	1,05	0.0530
19	aguda	98,3	0,00	1,71	1,12	0.6022
20	smoldering	100,0	0,00	0,00	1,02	0.0400

* Não avaliado

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Takatsuki K. Discovery of adult T-cell leukemia. *Retrovirology*. 2005; 2:16.
2. 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 U S A*. 1980;77(12):7415-9.
3. Gessain A, Cassar O. *Epidemiological aspects and World distribution of HTLV-1 Infection*. Front Microbiol. 2012; 3:388.
4. Carneiro-Proietti AB, Ribas JG, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GE, Martins-Filho OA, Pinheiro SR, Araújo Ade Q, Galvão-Castro B, de Oliveira MS, Guedes AC, Proietti FA. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002;35(5):499-508.
5. Rowan AG, Bangham CR. Is There a Role for HTLV-1-Specific CTL in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma?. *Leuk Res Treatment*. 2012; 2012:1-7
6. Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. Human t-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(4):266-81.
7. Marriott SJ, Semmes OJ. Impact of Htlv-I tax on cell cycle progression and the cellular dna damage repair response. *Oncogene*. 2005;24(39):5986-95
8. Jeang KT, Giam CZ, Majone F, Aboud M. Life, death, and tax: role of htlv-i oncoprotein in genetic instability and cellular transformation. *J Biol Chem*. 2004; 279(31):31991-4.
9. Taylor GP, Matsuoka M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. *Oncogene*. 2005; 24(39):6047-57.
10. Liu B, Liang MH, Kuo YL, Liao W, Boros I, Kleinberger T, Blancato J, Giam CZ. Human T-lymphotropic virus type 1 oncoprotein tax promotes unscheduled degradation of Pds1p/securin and Clb2p/cyclin B1 and causes chromosomal instability. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(15):5269-81.
11. Merling R, Chen C, Hong S, Zhang L, Liu M, Kuo YL, Giam CZ. HTLV-1 Tax mutants that do not induce G1 arrest are disabled in activating the anaphase promoting complex. *Retrovirology*. 2007; 4:35.
12. Wassmann K, Benezra R. Mitotic checkpoints: from yeast to cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2001; 11(1):83-90.

13. Kasai T, Iwanaga Y, Iha H, Jeang KT. Prevalent loss of mitotic spindle checkpoint in adult T-cell leukemia confers resistance to microtubule inhibitors. *J Biol Chem.* 2002; 277(7):5187-93.
14. Pei L, Melmed S. Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol.* 1997;11(4):433-41.
15. Tfelt-Hansen J, Kanuparthi D, Chattopadhyay N. The emerging role of pituitary tumor transforming gene in tumorigenesis. *Clin Med Res.* 2006; 4(2):130-7.
16. Auner HW, Zebisch A, Schimek MG, Bodner C, Hiden K, Linkesch W, Haas OA, Beham-Schmid C, Sill H. High expression of the sister-chromatid separation regulator and proto-oncogene hSecurin occurs in a subset of myeloid leukaemias but is not implicated in the pathogenesis of aneuploidy. *Leukemia.* 2004;18(2):303-8.
17. Maeda N, Fan H, Yoshikai Y. oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. *Rev Med Virol.* 2008; 18(6):387-405.
18. Gallo RC. history of the discoveries of the first human retroviruses: Htlv-1 And Htlv-2. *Oncogene.* 2005; 24(39):5926-30.
19. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human t-cell leukemia virus (Htlv-II) associated with a t-cell variant of hairy cell leukemia. *Science.* 1982; 218(4572):571-3.
20. Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, Gessain A. discovery of a new human t-cell lymphotropic virus (Htlv-3) In Central Africa. *Retrovirology.* 2005; 2:30.
21. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, Torimiro JN, Prosser At, Lebreton M, Mpoudi-Ngole E, Mccutchan FE, Bix DL, Folks TM, Burke Ds, Switzer Wm. Emergence of unique primate t-lymphotropic viruses among central african bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(22):7994-9.
22. Mueller N. The epidemiology of HTLV-I infection. *Cancer Causes Control.* 1991; 2(1):37-52.
23. Catalan-Soares BC, Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000) Aspectos epidemiológicos. *Rev Bras Epidemiol,* 2001; 4(2):81-95.
24. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol.* 2012; 3:388.

25. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB, Proietti FA. Heterogenous geografic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban áreas in Brazil. *Cad Saude Pública*, 2005; 21(3):926-931.
26. Sullivan MT, Williams AE, Fang CT, Grandinetti T, Poiesz BJ, Ehrlich GD. Transmission of human T-lymphotropic virus types I and II by blood transfusion. A retrospective study of recipients of blood components (1983 through 1988). The American Red Cross HTLV-I/II Collaborative Study Group. *Arch Intern Med*. 1991 ;151(10):2043.
27. Stuver SO, Tachibana N, Okayama A, Shioiri S, Tsunetoshi Y, Tsuda K, Mueller NE. Heterosexual transmission of human T cell leukemia/lymphoma virus type I among married couples in southwestern Japan: an initial report from the Miyazaki Cohort Study. *J Infect Dis*. 1993; 167(1):57-65.
28. Manns A, Hisada M, La Grenade L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet*. 1999; 353(9168):1951-8.
29. Kajiyama W, Kashiwagi S, Hayashi J, Nomura H, Ikematsu H, Okochi K. Intrafamilial clustering of anti-ATLA-positive persons. *Am J Epidemiol*. 1986; 124(5):800-6.
30. Okochi K, Sato H, Hinuma Y. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang*. 1984; 46(5):245-53.
31. Borducchi DM, Kerbaux J, de Oliveira JS. Lymphoma/leukemia of T cells in adults. *Rev Assoc Med Bras*. 1999; 45(1):63-70.
32. Hino S, Yamaguchi K, Katamine S, Sugiyama H, Amagasaki T, Kinoshita K, Yoshida Y, Doi H, Tsuji Y, Miyamoto T. Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia virus type-I. *Jpn J Cancer Res*. 1985; 76(6):474-80.
33. Wiktor SZ, Pate EJ, Murphy EL, Palker TJ, Champegne E, Ramlal A, Cranston B, Hanchard B, Blattner WA. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Jamaica: association with antibodies to envelope glycoprotein (gp46) epitopes. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1993; 6(10):1162-7.
34. Fujino T, Nagata Y. HTLV-I transmission from mother to child. *J Reprod Immunol*. 2000; 47(2):197-206.
35. Lairmore MD, Haines R, Anupam R. Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Current Opinion in Virology*. 2012; 2(4):474-481.
36. Boxus M e Willems L. Mechanisms of HTLV-1 persistente transformation. *Br J Cancer*. 2009; 101(9):1947-1501.

37. Mahieux R, Gessain A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: new members of the HTLV family. *Pathol Biol.* 2009; 57(2):161-6.
38. Hjelle B, Appenzeller O, Mills R, Alexander S, Torrez-Martinez N, Jahnke R, Ross G. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. *Lancet.* 1992; 339:645-6.
39. Yasunaga Ji, Sakai T, Nosaka K, Etoh Ki, Tamiya S, Koga S, Mita S, Uchino M, Mitsuya H, Matsuoka M. Impaired production of naive T lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals: its implications in the immunodeficient state. *Blood.* 2001; 97(10):3177-83.
40. Höllsberg P. Mechanisms of T-cell activation by human T-cell lymphotropic virus type I. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999; 63(2):308-33.
41. Santos FLM, Lima FWM. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnostico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. *J Bras Patol Med Lab.* 2005; 41 (2):105-116.
42. Magrath, I The Non-Hodgkins Lymphomas. Second Edition, New York: Arnold and Oxford University Press. 1997.
43. Kannian P, Green PL. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses.* 2010; 2(9):2037-77.
44. 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; 196(1):25-33.
45. Yasunaga J, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I induces Adult T-cell Leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms. *Cancer Control.* 2007; 14(2):133-140.
46. Taylor GP, Matsuoka M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. *Oncogene.* 2005; 24(39):6047-57.
47. Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell.* 2003; 115(4):449-59.
48. Jones KS, Petrow-Sadowski C, Bertolette DC, Huang Y, Ruscetti FW. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *J Virol.* 2005; 79(20):12692-702.
49. Ghez D, Lepelletier Y, Lambert S, Fourneau JM, Blot V, Janvier S, Arnulf B, van Endert PM, Heveker N, Pique C, Hermine O. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol.* 2006; 80(14):6844-54.

50. Karpas A. Human retroviruses in leukaemia and AIDS: reflections on their discovery, biology and epidemiology. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2004; 79(4):911-33.
51. Bangham CR. The immune control and cell-to-cell spread of human T lymphotropic virus type 1. *J Gen Virol.* 2003; 84:3177-3189.
52. Seiki M, Watanabe T, Komuro A, Miyoshi I, Hayami M, Yoshida M. Characterization of simian retrovirus genome related to human T-cell leukemia virus type I. *Princess Takamatsu Symp.* 1984;15:241-9
53. Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. adult t-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood.* 1977; 50(3):481-92
54. Catovsky D, Greaves MF, Rose M, Galton DA, Goolden AW, McCluskey DR, White JM, Lampert I, Bourikas G, Ireland R, Brownell AI, Bridges JM, Blattner WA, Gallo RC. Adult T-cell lymphoma-leukaemia in Blacks from the West Indies. *Lancet.* 1982; 1(8273):639-43.
55. Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K. Adult T cell leukemia: a review of epidemiological evidence. *Microbiol.* 2012; 3:322.
56. Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol.* 1991; 79(3):428-37.
57. Yasunaga J, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms. *Cancer Control.* 2007; 14(2):133-40.
58. Yamaguchi T, ohshima K, Karube K et al. Clinicopathological features of cutaneous lesions of adult t-cell leukemia/lymphoma. *Br J Dermatol.* 2005; 152:76-81.
59. Levine PH, Cleghorn F, Manns A, Jaffe ES, Navarro-Roman L, Blattner WA, Hanchard B, De Oliveira MS, Matutes E, Catovsky D, et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma: a working point-score classification for epidemiological studies. *Int J Cancer.* 1994 Nov 15; 59(4):491-3.
60. Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene.* 2005 Sep 5;24(39):6058-68.
61. Quereda V and Malumbres M. Cell cycle of pituitary development and disease. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2009; 42,75-86.
62. Ekholm SV, Zickert P, Reed SI, Zetterberg A. Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. *Mol Cell Biol.* 2001; 21(9):3256-65.

63. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Nat Acad Sci* 1974; 71 (4), 1286-1290.
64. Malumbres, M; Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*. 2005; vol:30 iss:11 pg:630 -41.
65. Donnellan R and Chetty R. Cyclin D1 and human neoplasia. *J Clin Pathol. Mol Pathol*. 1998; 51:1-7.
66. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*. 1999; 13(12):1501-12.
67. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1(3):222-31.
68. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 1993; 75(4):805-16.
69. Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*. 1994; 78(1):67-74.
70. Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev*. 1995; 9(6):650-62.
71. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993; 366(6456):704-7.
72. Vernell R1, Helin K, Müller H. Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway. *J Biol Chem*. 2003; 278(46):46124-37.
73. Zou H, McGarry TJ, Bernal T, Kirschner MW. Identification of a vertebrate sister-chromatid separation inhibitor involved in transformation and tumorigenesis. *Science*. 1999; 285(5426):418-22.
74. Zhang X, Horwitz GA, Heaney AP, Nakashima M, Prezant TR, Bronstein MD, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene (PTTG) expression in pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(2):761-7.
75. Kakar SS. Molecular cloning, genomic organization, and identification of the promoter for the human pituitary tumor transforming gene (PTTG). *Gene*. 1999; 240(2):317-24.
76. Heaney AP, Singson R, McCabe CJ, Nelson V, Nakashima M, Melmed S. Expression of pituitary-tumour transforming gene in colorectal tumours. *Lancet*. 2000; 355(9205):716-9.

77. Tsai SJ, Lin SJ, Cheng YM, Chen HM, Wing LY. Expression and functional analysis of pituitary tumor transforming gene-1 [corrected] in uterine leiomyomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(6):3715-23.
78. Hornig NC, Knowles PP, McDonald NQ, Uhlmann F. The dual mechanism of separase regulation by securin. *Curr Biol.* 2002; 12(12):973-82.
79. Jallepalli PV, Waizenegger IC, Bunz F, Langer S, Speicher MR, Peters JM, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Securin is required for chromosomal stability in human cells. *Cell.* 2001;105(4):445-57.
80. Latreille J, Barlogie B, Dosik G, Johnston DA, Drewinko B, Alexanian R. Cellular DNA content as a marker of human multiple myeloma. *Blood.* 1980; 55(3):403-8.
81. Barlogie B, Alexanian R, Dixon D, Smith L, Smallwood L, Delasalle K. Prognostic implications of tumor cell DNA and RNA content in multiple myeloma. *Blood.* 1985;66(2):338-41.
82. Nunez R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr Issues Mol Biol.* 2001;3(3):67-70.
83. Huang Q, Yu C, Zhang X, Goyal RK. Comparison of DNA histograms by standard flow cytometry and image cytometry on sections in Barrett's adenocarcinoma. *BMC Clin Pathol.* 2008;8:5.
84. Rabinovitch PS. DNA Content Histogram and Cell-Cycle Analysis. In: Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA. *Flow Cytometry*. San Diego: Academic Press, Inc.; 1994. Chap. 18, p. 263-296.
85. Gerashchenko BI, Huna A, Erenpreisa J. Characterization of breast cancer DNA content profiles as a prognostic tool. *Exp Oncol.* 2014; 36(4):219-25
86. Duigou F, Herlin P, Marnay J, Michels JJ. Variation of flow cytometric DNA measurement in 1,485 primary breast carcinomas according to guidelines for DNA histogram interpretation. *Cytometry.* 2000; 42(1):35-42.
87. Merkel DE, Dressler LG, McGuire WL. Flow cytometry, cellular DNA content, and prognosis in human malignancy. *J Clin Oncol.* 1987; 5(10):1690-703.
88. Levine PH, Cleghorn F, Manns A, Jaffe ES, Navarro-Roman L, Blattner WA, Hanchard B, De Oliveira MS, Matutes E, Catovsky D, et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma: a working point-score classification for epidemiological studies. *Int J Cancer.* 1994; 59(4):491-3.
89. Shadrach B, Warshawsky I. A comparison of multiplex and monoplex T-cell receptor gamma PCR. *Diagn Mol Pathol.* 2004; (3):127-34.

90. Chomczynski P.; Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acidic guanidium thiocyanatephenol-chlorophorm extraction. *Anal Biochem*, 1987; 162 (1):156-9.
91. 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.
92. Nicot C. HTLV-I tax-mediated inactivation of cell cycle checkpoints and DNA repair pathways contribute to cellular transformation: "a random mutagenesis model". *J Cancer Sci*.2015;2(2).
93. Baydoun HH, Bai XT, Shelton S, Nicot C. HTLV-I tax increases genetic instability by inducing DNA double strand breaks during DNA replication and switching repair to NHEJ. *PLoS One*. 2012; 7(8):
94. Arainga M, Murakami H, Aida Y. Visualizing spatiotemporal dynamics of apoptosis after G1 arrest by human T cell leukemia virus type 1 Tax and insights into gene expression changes using microarray-based gene expression analysis. *BMC Genomics*. 2012; 13:275.
95. Liu M, Yang L, Zhang L, Liu B, Merling R, Xia Z, Giam CZ. Human T-cell leukemia virus type 1 infection leads to arrest in the G1 phase of the cell cycle. *J Virol*. 2008; 82(17):8442-55.
96. Fukuda R, Tsuchiya K, Suzuki K, Itoh K, Fujita J, Utsunomiya A, Tsuji T. HTLV-I Tax regulates the cellular proliferation through the down-regulation of PIP3-phosphatase expressions via the NF- κ B pathway. *Int J Biochem Mol Biol*. 2012; 3 (1):95-104.
97. Fukuda R, Hayashi A, Utsunomiya A, Nukada Y, Fukui R, Itoh K, Tezuka K, Ohashi K, Mizuno K, Sakamoto M, Hamanoue M, Tsuji T. Alteration of phosphatidylinositol 3-kinase cascade in the multilobulated nuclear formation of adult T cellleukemia/lymphoma (ATLL). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102 (42): 15213-8.
98. Kuo YL, Giam CZ. Activation of the anaphase promoting complex by HTLV-1 tax leads to senescence. *EMBO J*. 2006; 25(8): 1741-52.
99. Yang L, Kotomura N, Ho YK, Zhi H, Bixler S, Schell MJ, Giam CZ. Complex cell cycle abnormalities caused by human T-lymphotropic virus type 1 Tax. *J Virol*. 2011; 85(6): 3001-9.
100. Sibon D, Gabet AS, Zandecki M, Pinatel C, Thôte J, Delfau-Larue MH, Rabaaoui S, Gessain A, Gout O, Jacobson S, Mortreux F, Wattel E. HTLV-1 propels untransformed CD4 lymphocytes into the cell cycle while protecting CD8 cells from death. *J Clin Invest*. 2006; 116(4): 974-83.

101. Liu B, Liang MH, Kuo YL, Liao W, Boros I, Kleinberger T, Blancato J, Giam CZ. Human T-lymphotropic virus type 1 oncoprotein tax promotes unscheduled degradation of Pds1p/securin and Clb2p/cyclin B1 and causes chromosomal instability. *Mol Cell Biol.* 2003; 23(15):5269-81.
102. Hagting A, Den Elzen N, Vodermaier HC, Waizenegger IC, Peters JM, Pines J. Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol.* 2002; 157(7):1125-37.
103. Liu B, Hong S, Tang Z, Yu H, Giam. HTLV-I Tax directly binds the Cdc20-associated anaphase-promoting complex and activates it ahead of schedule. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(1):63-8.
104. Izawa D, Pines J. How APC/C-Cdc20 changes its substrate specificity in mitosis. *Nat Cell Biol.* 2011; 13(3):223-33.
105. Pfliegerhaer K, Heubes S, Cox J, Stemmann O, Securin is not required for chromosomal stability in human cells. *PLoS Biol.* 2005; 3(12).
106. Bangham CR, Osame M. Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene.* 2005; 24(39): 6035-46.
107. Asquith B, Bangham CR. Quantifying HTLV-I dynamics. *Immunol Cell Biol.* 2007;85(4):280-6.
108. Miyazato P, Yasunaga J, Taniguchi Y, Koyanagi Y, Mitsuya H, Matsuoka M. De novo human T-cell leukemia virus type 1 infection of human lymphocytes in NOD-SCID, common gamma-chain knockout mice. *J Virol.* 2006; 80(21):10683-91.
109. Yashiki S, Fujiyoshi T, Arima N, et al. HLA-A*26, HLA-B*4002, HLA-B*4006, and HLA-B*4801 alleles predispose to adult T cell leukemia: the limited recognition of HTLV type 1 tax peptide anchor motifs and epitopes to generate anti-HTLV type 1 tax CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2001; 17(11): 1047–1061.
110. Kirschner D, Webb GF. A model for treatment strategy in the chemotherapy of AIDS. *Bull Math Biol.* 1996 ;58(2):376-90.
111. Nelson, P. W., Murray, J. D., & Perelson, A. S. A model of HIV-1 pathogenesis that includes an intracellular delay. *Math. Biosci.* 2000; 163(2):201–215.
112. Li MY, Lim AG. Modelling the role of Tax expression in HTLV-I persistence in vivo. *Bull Math Biol.* 2011;73(12):3008-29.
113. Kim DS, Fong J, Read ML, McCabe CJ. The emerging role of pituitary tumour transforming gene (PTTG) in endocrine tumourigenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2007 ;278(1-2):1-6.

114. Filippella M, Galland F, Kujas M, Young J, Faggiano A, Lombardi G, Colao A, Meduri G, Chanson P. Pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression correlates with the proliferative activity and recurrence status of pituitary adenomas: a clinical and immunohistochemical study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2006 ;65(4):536-43.
115. Ishitsuka Y, Kawachi Y, Taguchi S, Maruyama H, Nakamura Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Pituitary tumor-transforming gene 1 as a proliferation marker lacking prognostic value in cutaneous squamous cell carcinoma. *Exp Dermatol*. 2013; 22(5):318-22.
116. Talvinen K, Tuikkala J, Nevalainen O, Rantanen A, Hirsimäki P, Sundström J, Kronqvist P. Proliferation marker securin identifies favourable outcome in invasive ductal breast cancer. *Br J Cancer*. 2008 ;99(2):335-40.
117. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984 ; 133(4):1710-5.
118. Chen Z, Merta PJ, Lin NH, Tahir SK, Kovar P, Sham HL, Zhang H. A-432411, a novel indolinone compound that disrupts spindle pole formation and inhibits human cancer cell growth. *Mol Cancer Ther*. 2005 ;4(4):562-8.
119. Chao JI, Liu HF The blockage of survivin and securin expression increases the cytochalasin B-induced cell death and growth inhibition in human cancer cells. *Mol Pharmacol*. 2006; 69(1):154-64.
120. Zhang X, Horwitz GA, Prezant TR, Valentini A, Nakashima M, Bronstein MD, Melmed S. Structure, expression, and function of human pituitary tumor-transforming gene (PTTG). *Mol Endocrinol*. 1999 (1):156-66.
121. Ramos-Morales F1, Domínguez A, Romero F, Luna R, Multon MC, Pintor-Toro JA, Tortolero M. Cell cycle regulated expression and phosphorylation of hpttg proto-oncogene product. *Oncogene*. 2000; 19(3):403-9.
122. Domínguez A, Ramos-Morales F, Romero F, Rios RM, Dreyfus F, Tortolero M, Pintor-Toro JA. hpttg, a human homologue of rat pttg, is overexpressed in hematopoietic neoplasms. Evidence for a transcriptional activation function of hPTTG. *Oncogene*. 1998; 17(17):2187-93.
123. Hagting A, Den Elzen N, Vodermaier HC, Waizenegger IC, Peters JM, Pines J. Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol*. 2002;157(7):1125-37.
124. Talvinen K, Karra H, Hurme S, Nykänen M, Nieminen A, Anttinen J, Kuopio T, Kronqvist P. *Br J Cancer*. 2009;101(6):1005-10.

125. Waizenegger I, Giménez-Abián JF, Wernic D, Peters JM Regulation of human separase by securin binding and autocleavage. *Curr Biol*. 2002; 2(16):1368-78.
126. Nasmyth K How do so few control so many? *Cell*. 2005;120(6):739-46.
127. Liang MH, Geisbert T, Yao Y, Hinrichs SH, Giam CZ Human T-lymphotropic virus type 1 oncoprotein tax promotes S-phase entry but blocks mitosis. *J Virol*. 2002; 76(8):4022-33.
128. Baydoun HH, Pancewicz J, Bai X, Nicot C. HTLV-I p30 inhibits multiple S phase entry checkpoints, decreases cyclin E-CDK2 interactions and delays cell cycle progression. *Mol Cancer*. 2010; 9:302.
129. Bai XT, Nicot C. Overview on HTLV-1 p12, p8, p30, p13: accomplices in persistent infection and viral pathogenesis. *Front Microbiol*. 2012; 3:400.
130. Sotillo R, Hernando E, Díaz-Rodríguez E, Teruya-Feldstein J, Cordón-Cardo C, Lowe SW, Benezra R. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell*. 2007;11(1):9-23.
131. Saunders WS, Shuster M, Huang X, et al. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 2000;97(1):303-8.
132. Marumoto T, Hirota T, Morisaki T, Kunitoku N, Zhang D, Ichikawa Y et al. Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells* 7:1173–82.
133. Tong Y, Ben-Shlomo A, Zhou C, Wawrowsky K, Melmed S. Pituitary tumor transforming gene 1 regulates Aurora kinase A activity. *Oncogene*. 2008; 27(49):6385-95.
134. Lukasiewicz KB, Lingle WL. Aurora A, centrosome structure and the centrosome cycle. *Environ Mol Mutagen*. 2009; 50:602-19.
135. Bolanos-Garcia VM. Aurora kinases. *Int J. Biochem Cell Biol*. 2005;37:1572-7
136. Tomita, M. and Mori, N. Aurora A selective inhibitor MLN8237 suppresses the growth and survival of HTLV-1-infected T-cells *in vitro*. *Cancer Sci*. 2010;101: 1204–11.