UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Papel dos microRNAs humanos na infecção pelo HTLV-1

Larissa Deadame de Figueiredo Nicolete

Ribeirão Preto

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Papel dos microRNAs humanos na infecção pelo HTLV-1

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para Obtenção do Título
de Mestre em Biociências Aplicadas à
Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientada: Larissa Deadame de Figueiredo
Nicolete

Orientadora: Simone Kashima Haddad

Ribeirão Preto

2009

NICOLETE, L.D.F.	Papel dos microRNAs na infecção pelo HTLV-1		MESTRADO FCFRP-USP 2009
---------------------	--	--	-------------------------------

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Nicolete, Larissa Deadame de Figueiredo
Papel dos microRNAs na infecção pelo HTLV-1. Ribeirão Preto, 2009.
110 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientadora: Kashima, Simone

1. microRNAs. 2. HTLV-1. 3. HAM/TSP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Larissa Deadame de Figueiredo Nicolete

Papel dos microRNAs na infecção pelo HTLV-1

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Biociências Aplicadas à
Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientadora: Simone Kashima Haddad

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esta dissertação aos meus pais, minha avó, minha irmã e meu tio, paixões da minha vida, que desde a minha existência acreditam em mim, mesmo quando eu titubeio. Dedico também aos meus sogros, que estão presentes desde o começo da minha vida acadêmica. Por fim, dedico ao amor da minha vida, *mi media naranja*, homem justo e sensato, que com seus olhos azuis torna meu mundo cor-de-rosa.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pacientes por terem doado as amostras para a realização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a Simone Kashima Haddad por sua orientação, ensinamentos e disponibilidade que me ajudaram a concretizar esta dissertação. Obrigada pela confiança em mim depositada e por todas as oportunidades que me concedeu.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa de mestrado concedida para o desenvolvimento desta pesquisa (06/59388-4).

Ao Prof Dr Dimas Tadeu Covas, pela confiança e viabilização de todos os experimentos realizados na Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

Ao Dr Roberto Nicolete pelas calorosas discussões científicas. Além do apoio emocional, seus ensinamentos profissionais foram essenciais nesta jornada.

Às mestras e funcionárias Evandra Strazza Rodrigues e Rochele Azevedo pelo auxílio prestado na realização de diversos experimentos e pelo carinho.

Aos colegas de laboratório, com os quais tenho o prazer de conviver e constituem um sólido grupo de pesquisa e amizade. Agradeço à doutoranda Maria Fernanda de Castro Amarante, à mestranda Tathiane Maistro Malta Pereira e aos biomédicos Mariana Tomazini Pinto e Maurício Cristiano Rocha Júnior. Agradeço de maneira especial ao doutorando Rodrigo Haddad, cuja estada na Inglaterra foi imprescindível para a finalização desta dissertação.

À Prof^a Dr^a Fabíola Attié de Castro pela amizade e ensinamentos durante todo o período. As doutorandas do laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto: Aline Fernanda Ferreira, Elaine Lino Gasparotto, Gislane Lelis Vilela de Oliveira e Raquel Tognon. Muito obrigada pela contribuição neste trabalho, referente à metodologia de *Western blot* e pela imensa amizade que compartilhamos.

À mestra Anemari Ramos Dinarte dos Santos e ao técnico especialista Israel Tojal da Silva do laboratório de Clonagem e Expressão Gênica do Hemocentro de Ribeirão Preto. Obrigada pelo apoio técnico nas análises de Bioinformática e grande amizade.

Às funcionárias do Laboratório de Citometria de Fluxo Camila Cristina de Oliveira Menezes e Patrícia Vianna Bonini Palma. Obrigada pelos ensinamentos referentes a esta técnica que compõem este trabalho e pelo carinho.

Às secretárias Carmen Cecília de Oliva Simão e Dalva Tereza Catto, pela disponibilidade, carinho e atenção com que sempre me atenderam.

Ao Laboratório de Sorologia do Hemocentro de Ribeirão Preto pela realização dos ensaios imunoenzimáticos e pela grande amizade.

À Prof^a Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini, à Prof^a Dr^a Regina Célia Cândido e aos secretários da pós-graduação Rosana Florêncio, Ana Lúcia Turatti, Rossana Minghelli Ribeiro, Henrique Theodoro e Carlos Armando Faustino. Muito obrigada pela competência, atenção e dedicação que me atenderam nestes anos.

A todos os meus amigos do Hemocentro e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, que contribuíram de maneira indireta nesta dissertação, através do carinho e amor que sempre compartilharam comigo.

“O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

RESUMO

NICOLETE, L.D.F. **Papel dos microRNAs na infecção pelo HTLV-1**. 2009. 110f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MicroRNAs (miRNAs) são RNA de fita simples (≈ 22 nucleotídeos) que atuam como reguladores da expressão gênica celular. Estudos recentes têm demonstrado o papel dos miRNAs como moduladores da resposta celular frente às infecções virais. O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus que apresenta genes estruturais comuns aos demais, além dos genes *tax* e *rex*, os quais dão origem às proteínas regulatórias. Entre elas, destaca-se a oncoproteína Tax, que é capaz de modular a expressão de genes celulares e virais, além de estar associada ao desencadeamento de patologias. Destacam-se duas manifestações clínicas associadas: a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e a mielopatia associada ao HTLV/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Fatores relacionados ao hospedeiro também estão correlacionados ao aparecimento das patologias. No intuito de estabelecer se miRNAs humanos podem influenciar em processos celulares que se encontram desregulados pela Tax (diferenciação, transdução de sinais, apoptose, proliferação celular e tumorigênese), o objetivo deste projeto foi analisar a expressão de miRNAs em células mononucleares de sangue periférico (PBMc) de indivíduos infectados HTLV-1. Para tanto, realizamos análises *in silico* para mapear alvos de miRNAs humanos no gene *tax* do HTLV-1. Foram utilizados dois algoritmos (*miRanda* e *RNAhybrid*), com os seguintes parâmetros: *score* de 120 na região da semente; energia livre de até -15 kcal/mol. Assim, selecionou-se os hsa-miRNAs:149a, 648, 221, 222, 142-5p, 26a, 29a, 374 e 125b. Adicionalmente, foi observado que as regiões do gene *tax*, onde se ligam os miRNAs selecionados, são extremamente conservadas entre os diferentes subtipos de HTLV-1. Após estas análises *in silico*, realizou-se a validação dos miRNAs eleitos. Para tanto, foram isolados PBMc de 21 amostras de indivíduos-controle (CT), 10 portadores assintomáticos do HTLV-1 (HAC) e 12 com HAM/TSP (HAM). Do total de células, 1×10^6 tiveram seu DNA genômico extraído para quantificação da carga proviral (CPV) pela metodologia de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR); 1×10^6 foram criopreservadas para quantificação de Tax por citometria de fluxo; 1×10^7 células foram utilizadas na extração de RNA para validação dos miRNAs por qRT-PCR. A fase orgânica do Trizol® foi utilizada para extração de proteínas totais e posterior análise da expressão de Tax por *Western blot*. A CPV apresentou-se significativamente aumentada ($p = 0,0046$) no grupo HAM, quando utilizado teste de Mann-Whitney. A expressão de Tax apresentou correlação significativa ($p = 0,0128$) com a CPV, pelo teste de Spearman e auxiliou na caracterização dos pacientes. O nível de expressão dos miRNAs foi avaliado nos grupos: CT vs Pacientes e CT vs HAC vs HAM por testes não-paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal-wallis, respectivamente. Os miRNAs se mostraram desregulados no grupo de pacientes quando comparado ao grupo CT. Dentre estes, o hsa-miR-125b encontra-se aumentado significativamente no grupo de pacientes em relação ao controle ($p = 0,0285$). Utilizou-se o teste de correlação de Spearman, para associar a expressão de Tax com os miRNAs, porém os resultados encontrados não foram significativos. Apesar de não estar correlacionado com expressão de Tax, o hsa-miR-125b é responsável pela regulação de diversas proteínas, como TNF- α , uma proteína inflamatória hiper-expressa em portadores do HTLV-1. Deste modo, acreditamos que este miRNA estaria aumentado proporcionalmente na tentativa de inibir a tradução desta proteína. Os resultados deste projeto sugerem a importância de esclarecer como os miRNAs humanos podem regular a infecção pelo HTLV-1 e gerar informações para o desenvolvimento de estratégias que possam interferir com a replicação e patogênese viral.

Palavras-chave: HTLV-1; HAM/TSP; Tax; microRNAs

ABSTRACT

NICOLETE, L.D.F. **The role of microRNAs in HTLV-1 infection.** 2009. 116f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

MicroRNAs (miRNAs) are simple strand RNA (≈ 22 nucleotides), which are regulators of cellular gene expression. Recent studies have been showed miRNAs' role as modulators of cellular responses, when viral infection occurs. The human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a retrovirus that presents the same regular structural genes compared to the other retrovirus, besides tax and rex genes, which encode regulatory proteins. In regard to this, Tax oncoprotein is a major determinant of viral persistence and pathogenesis. Two major diseases are related to this virus adult T cell leukemia (ATLL) and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Host-related factors are also correlated with HAM/TSP development. To establish if human miRNAs could influence in the unregulated cellular process caused by Tax (differentiation, signal transduction, apoptosis, cellular proliferation and tumorigenesis), this study analyzed miRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from HTLV-1 infected patients. For this purpose, we performed *in silico* analyses to find human miRNAs that could targeted HTLV-1 tax region. We performed two algorithms (*miRanda* e *RNAhybrid*) and we set up two distinct parameters: score more than 120 in the seed region and minimum free energy until -15 kcal/mol. So, we have selected these hsa-miRNAs:149a, 648, 221, 222, 142-5p, 26a, 29a, 374 e 125b. Besides this, we compared several HTLV-1 sub-types and we observed that regions, where miRNAs are regulating, are extremely conserved. After the *in silico* analysis, we validated miRNAs that we have been chosen. We isolated PBMC samples from 21 control-individuals (CT), 10 from asymptomatic carriers and 12 from HAM/TSP (HAM). After the procedure, genomic DNA were extracted from 1×10^6 cells, in order to quantify the proviral load (PL) performing quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR). Tax was measured by flow cytometry and for this procedure, we used 1×10^6 criopreserved cells. Amount 1×10^7 cells were used to total RNA extraction that was used to miRNAs validation by qRT-PCR. The organic phase from Trizol® was employed to extract total proteins, which were used to analyze Tax expression by *Western blot*. The PL was significantly higher in HAM group than HAC ($p=0,0046$), when Mann-Whitney statistical test was employed. The Tax expression was significantly correlated to PL ($p=0,0128$) by Spearmann test and this finding provided us a better characterization of the patients. The miRNAs expression was detected in the following groups: CT vs Patients and CT vs HAC vs HAM by non-parametrical tests Mann-Whitney and Kruskal-wallis, respectively. The miRNAs presented unregulated themselves in the patient group, when we compared to CT group. We observed that hsa-miR-125b expression are significantly higher in patients group than controls ($p=0,0285$). We have tried to associate miRNAs with Tax expression, employing Spearmann test, but this analysis did not show significant values. Despite this, hsa-miR-125b is responsible for regulating several proteins, such as TNF- α , which is an inflammatory protein overexpressed in HTLV-1 carriers. In conclusion, we propose that this miRNA could be increased as a way to inhibit TNF- α translation. These results suggest the importance in understanding how human miRNAs could regulated the HTLV-1 infection. In addition to this, they could generate data to be used as therapeutic strategies for the control of viral replication and pathogenic processes.

Keywords: HTLV-1; HAM/TSP; Tax; microRNAs

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Biogênese dos miRNAs.....	3
Figura 2. Complexidade das interações entre miRNAs e RNAm de células infectadas por vírus	5
Figura 3. Genoma do HTLV-1 e produtos codificados.....	8
Figura 4. Fluxograma da estratégia experimental.....	14
Figura 5. Esquema da transcrição reversa pela utilização de <i>looped RT primers</i>	27
Figura 6. Mecanismo de amplificação dos miRNAs por qRT-PCR.....	28
Figura 7. Dados gerados pelos softwares <i>miRanda</i> e <i>RNAhybrid</i>	31
Figura 8. miRNAs distribuídos em diferentes posições do gene <i>tax</i>	36
Figura 9. Alinhamento parcial da região do gene <i>tax</i> do HTLV-1.....	37
Figura 10. Caracterização linfocitária dos indivíduos soropositivos para HTLV-1.....	40
Figura 11. Curva-padrão dos genes <i>β-actina</i> e <i>tax</i>	40
Figura 12. Distribuição da carga proviral entre os indivíduos HAC e HAM	41
Figura 13. Expressão das proteínas Tax e tubulina.....	42
Figura 14. Expressão proteica de Tax e tubulina em indivíduos infectados pelo HTLV-1	42
Figura 15. Expressão proteica de Tax e tubulina em indivíduos infectados pelo HTLV-1	42
Figura 16. Gráfico em <i>dot plot</i> da viabilidade celular.....	44
Figura 17. Análise em <i>dot plot</i> dos pacientes HAC para expressão de CD4 e Tax.....	45
Figura 18. Análise em <i>dot plot</i> dos pacientes HAM/TSP para expressão de CD4 e Tax.	46
Figura 19. Análise da correlação, pelo teste não-paramétrico de Spearmann.....	49
Figura 20. Expressão dos RNU utilizados como controles endógenos.....	50
Figura 21. Gráfico da correlação entre os diferentes RNU analisados.....	51
Figura 22. Expressão relativa do hsa-miR-221.....	52
Figura 23. Expressão relativa do hsa-miR-222.....	53
Figura 24. Expressão relativa do hsa-miR-374.....	54
Figura 25. Expressão relativa do hsa-miR-142-5p.....	54
Figura 26. Expressão relativa do hsa-miR-26a.....	55
Figura 27. Expressão relativa do hsa-miR-29a.....	56
Figura 28. Expressão relativa do hsa-miR-125b.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo dos softwares utilizados para análise de Bioinformática.....	15
Tabela 2. Caracterização demográfica de controles e pacientes.....	16
Tabela 3. Sequência de <i>primers</i> utilizados para qRT-PCR.....	22
Tabela 4. Análise dos miRNAs contra o gene <i>tax</i> do HTLV-1, pelo algoritmo <i>miRanda</i>	33
Tabela 5. Análise dos miRNAs contra o gene <i>tax</i> do HTLV-1, pelo algoritmo <i>RNAhybrid</i>	34
Tabela 6. Caracterização dos indivíduos soropositivos para HTLV-1 e controles.....	38
Tabela 7. Expressão da proteína Tax pela metodologia de <i>Western blot</i>	43
Tabela 8. Expressão da proteína Tax pela metodologia de citometria de fluxo.....	47
Tabela 9. Valores obtidos quanto a CPV e expressão da proteína Tax.....	48
Tabela 10. Valores do coeficiente de correlação de <i>Spearman</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3´	= região carboxi-terminal do ácido nucléico
5´	= região amino-terminal do ácido nucléico
Ago2	= enzima argonauta 2
ATLL	= leucemia/ linfoma de células T do adulto
CPV	= carga Proviral
Ct	= <i>cycle threshold</i>
CT	= indivíduos-controle
CTL	= linfócitos T citotóxicos
DEPC	= dietil-piro-carbato
DGCR-8	= <i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
DICER	= enzima da família das ribonucleases tipo III
DNA	= ácido desoxirribonucleico
EIA	= ensaio imunoenzimático
FCFRP	= Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FITC	= isotiocianato de fluoresceína
FMRP	= Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FUNDHERP	= Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto
HAC	= portador assintomático do vírus linfotrópico de células T humanas
HAM/TSP	= mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia espástica tropical
HC-RP	= Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto
HCV	= vírus da hepatite C
HIV	= vírus da imunodeficiência humana
hsa-miR	= microRNA pertencente à espécie <i>Homo sapiens</i>
HTLV-1	= vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1
HTLV-2	= vírus linfotrópico de células T humanas tipo 2
HTLV-3	= vírus linfotrópico de células T humanas tipo 3
HTLV-4	= vírus linfotrópico de células T humanas tipo 4
IDV	= <i>integrated density value</i>
IgG	= imunoglobulina G

Lt4	= anticorpo anti-Tax do HTLV-1
LTR	= <i>long terminal repeat</i>
mA	= miliamperes
miRNA	= microRNA
pb	= pares de base
PBMC	= células mononucleares do sangue periférico
PBS	= tampão salina fosfato
PCR	= reação em cadeia da polimerase
PVDF	= polifluoreto de vinilideno
qRT-PCR	= reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
r^2	= coeficiente de correlação
RISC	= complexo de silenciamento induzido de RNA
RNA	= ácido ribonucleico
RNA _m	= ácido ribonucleico mensageiro
RPMI	= <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	= transcrição reversa
SDS	= dodecil sulfato de sódio
<i>slope</i>	= valor de inclinação da reta
T CD4 ⁺	= linfócito T auxiliador
T CD8 ⁺	= linfócito T citotóxico
<i>tax</i>	= gene regulador de transativação do HTLV-1
TAX	= fosfoproteína transativadora do HTLV-1
TBS-T	= tampão Tris-Salino Tween
TRBP	= <i>transactivating response RNA-binding protein</i>
USP	= Universidade de São Paulo
UTR	= <i>untranslated region</i>
V	= volts
q.s.p.	= quantidade suficiente para

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	11
3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Análises <i>in silico</i>	14
3.1.1 Detecção <i>in silico</i> de miRNAs que possuem alvo no gene <i>tax</i> do HTLV-1.....	14
3.1.2 Comparação da conservação das regiões-alvo do gene <i>tax</i> entre os diferentes subtipos de HTLV-1.....	16
3.2 Casuística.....	16
3.2.1 Aspectos éticos.....	17
3.3 Sorologia e PCR para HTLV-1 e 2.....	18
3.4 Leucograma e contagem de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	18
3.5 Isolamento de células mononucleares por densidade.....	18
3.5.1 Extração e quantificação de DNA.....	19
3.5.2 Extração e quantificação de RNA.....	20
3.6 Cultivo e expansão da linhagem MT-2.....	20

3.7 Quantificação absoluta da carga proviral (CPV) do HTLV-1 por PCR em Tempo Real.....	21
3.7.1 Cálculo da quantificação da carga proviral (CPV).....	22
3.8 Extração de proteínas pelo método de Trizol®.....	22
3.9 Quantificação de proteínas totais.....	23
3.10 Análise da expressão da proteína Tax por <i>Western blot</i>	23
3.10.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	23
3.10.2 <i>Western blot</i>	24
3.11 Análise da expressão da proteína Tax por citometria de fluxo.....	25
3.12 Validação dos miRNAs pela metodologia do PCR em Tempo Real..	26
3.12.1 Transcrição reversa (RT).....	26
3.12.2 Reação de Amplificação.....	27
3.12.3 Cálculo da quantificação relativa.....	28
3.13 Análise estatística.....	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Detecção <i>in silico</i> de miRNAs humanos que possuem alvos no gene tax do HTLV-1.....	31
4.2 Caracterização clínica dos pacientes.....	37
4.3 Expressão da proteína tax por <i>Western blot</i>	41
4.4 Expressão da proteína Tax por citometria de fluxo.....	43
4.5 Correlações entre a expressão de proteína Tax e CPV.....	47
4.6 Análise da expressão dos miRNAs maduros pela metodologia do PCR em Tempo Real.....	49

4.6.1	Quantificação dos RNU utilizados como controle endógeno...	49
4.6.2	Análises dos hsa-miR-149 e hsa-miR-648.....	52
4.6.3	Análise do hsa-miR-221.....	52
4.6.4	Análise do hsa-miR-222.....	52
4.6.5	Análise do hsa-miR-142-5p.....	53
4.6.6	Análise do hsa-miR-26a.....	54
4.6.7	Análise do hsa-miR-29a.....	55
4.6.8	Análise do hsa-miR-374.....	55
4.6.9	Análise do hsa-miR-125b.....	56
4.4	Análise da correlação entre carga proviral e os miRNAs.....	57
5.	DISCUSSÃO.....	58
6.	CONCLUSÕES.....	72
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
	APÊNDICE.....	84
	APÊNDICE I – Alinhamento parcial da região do gene tax do HTLV-1	
	ANEXOS.....	88
	Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.	
	Anexo B – Termo de Consentimento livre e esclarecido dos pacientes	
	Anexo C – Termo de Consentimento livre e esclarecido dos controles	

1. INTRODUÇÃO

1.1 MicroRNAs (miRNAs)

1.1.1 Aspectos Gerais

A descoberta dos miRNAs como inibidores pós-transcricionais ocorreu durante análise da expressão dos genes responsáveis pelo desenvolvimento do *Caenorhabditis elegans*. Lee et al. (1993) demonstraram que o gene *lin-4* não era traduzido em proteína, mas originava dois pequenos RNA. A hipótese inicial era de que esses RNA, denominados *let-7*, estariam presentes nos nematóides e seriam responsáveis pelo complexo processo de crescimento larval. Porém, novas descobertas mostraram que esses RNA são expressos em quase todos os seres eucariotos e que são importantes reguladores da expressão gênica (ZAMORE & HALEY, 2005).

Em humanos existem quase 700 miRNAs identificados (GRIFFITHS-JONES et al., 2008), os quais são transcritos a partir de regiões intergênicas, íntrons e éxons (LANDGRAF et al., 2007). Apesar de estarem localizados em regiões variadas do genoma, muitos miRNAs são expressos comumente. Outros têm sido descritos e identificados como presentes em células de tecido-específicos, como no caso do hsa-miR-122, o qual é expresso exclusivamente nos hepatócitos (BARTEL, 2004; LIM et al., 2003b).

Dessa forma, a participação dos miRNAs em vários processos funcionais das células como proliferação, sobrevivência e apoptose começaram a ser estabelecidos, bem como sua participação na fisiopatologia das doenças (DI LEVA et al., 2006; SONKOLY & PIVARCSI 2009).

1.1.2 Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs

A produção de miRNAs é um processo complexo e coordenado, em que operam diferentes grupos de enzimas e proteínas nucleares e citoplasmáticas (Figura 1). O processo se inicia no núcleo pela transcrição de um precursor, pela RNA polimerase II, denominado de pri-miRNA (LANDGRAF et al., 2007). Este pri-miRNA contém aproximadamente 2 quilobases, um *loop*, *cap* na região 5' e poliadenilação na região 3' (CAI et al., 2004). O pri-miRNA formado é processado pelo complexo Drosha-DGCR8 (DENLI et al., 2004; HAN et al., 2004), o qual cliva o pri-miRNA e produz o pre-miRNA. Este é um miRNA dupla-fita em forma de grampo, com cerca de 70 nucleotídeos e uma saliência

de dois nucleotídeos na região 3', a qual faz com que o pre-miR seja reconhecido pela Exportina-5 e transportado para o citoplasma via GTP (BOHNSACK et al., 2004; LUND et al., 2004; YI et al., 2003).

Figura 1. Biogênese dos miRNAs. Um dado gene que codifica um miRNA é transcrito pela polimerase II, gerando o pri-miRNA. No núcleo, o complexo DGCR8-Drosha cliva o pri-miRNA em um RNA de cerca de 70 nucleotídeos, chamado pre-miRNA. Este é reconhecido pela Exportina-5 e conduzido ao citoplasma, onde é processado pela Dicer-TRBP, perdendo o *loop* e tornando-se o miRNA *duplex*. A enzima Argonauta2 é recrutada para formar o complexo RISC, que seleciona uma das fitas do miRNA para ser mantida no interior do complexo, enquanto a outra é degradada (retirado de BUSHATI & COHEN, 2007).

Esse pre-miRNA, quando no citoplasma, é processado pelo *duplex* TRBP-Dicer, perdendo o *loop* e se transformando em um miRNA dupla-fita

maduro com cerca de 22 nucleotídeos (CHENDRIMADA et al., 2005). Em seguida, a TRBP muda sua conformação e, ainda ligada à Dicer, recruta a proteína Ago2 para formar o complexo ribonucleoprotéico trimérico denominado RISC (GREGORY et al., 2005). Assim, uma das fitas do miRNA maduro é selecionada para permanecer ligada ao complexo, enquanto a outra é degradada (SCHWARZ et al., 2003). Após a seleção da fita simples do miRNA maduro, esta guia o RISC até seu RNAm alvo para que haja sua regulação. Nos mamíferos, geralmente ocorre a inibição da tradução do RNAm, após a ligação complementar com pelo menos cinco dos oito nucleotídeos da região 5' do miRNA (ZENG & CULLEN, 2003). Essa região composta pelos oito primeiros nucleotídeos é conhecida como a região da semente (*seed region*) e tem sido descrita como crucial para a inibição do RNAm alvo. Adicionalmente, uma boa ligação na região 3'UTR do miRNA também deve ser observada, principalmente quando há pareamento de apenas quatro nucleotídeos na região da semente (BRENNECKE et al., 2005).

1.1.3 miRNAs e interação vírus-hospedeiro

Como consequência da descoberta dos miRNAs nos processos pós-transcricionais, ocorreu o questionamento do papel destes em células infectadas por vírus. Até o momento, foram descobertos 11 vírus que conseguem codificar seu próprio miRNA, como o vírus Epstein-Barr (PFEFFER et al., 2004), Citomegalovírus humano (PFEFFER et al., 2005), o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (OMOTO & FUJII, 2005), entre outros. Além dos miRNAs virais, os que são produzidos pela célula hospedeira também podem atuar mediando a interação vírus-hospedeiro.

Jopling et al. (2005) descreveram que o hsa-miR-122 auxilia na replicação do vírus da hepatite C (HCV) e quando inibido faz com que a quantidade de partículas virais produzidas pelos hepatócitos diminua significativamente. Outro exemplo é o HIV-1 (HOUZET et al. 2008), cuja infecção faz com que células humanas infectadas apresentem mudanças na expressão dos miRNAs. Estes autores demonstraram que ocorre alteração no perfil de expressão de diversos miRNAs e que esta é dependente da carga proviral e da contagem de linfócitos T CD4⁺ dos indivíduos, o que sugere a utilização de miRNAs como marcadores prognósticos.

Essas evidências demonstram que hospedeiros e vírus estão aptos a codificar miRNAs, os quais podem interagir com RNAm transcrito pelo vírus ou pelo hospedeiro. Além dessas interações, não se deve negligenciar o papel que os miRNAs exercem naturalmente na expressão gênica da célula hospedeira, o que pode tornar esses mecanismos pós-transcricionais muito complexos, como mostrado na Figura 2 (SCARIA et al., 2006).

Figura 2. Complexidade das interações entre miRNAs e RNAm de células infectadas por vírus. As setas de cor laranja representam transcritos virais e as de cor azul os transcritos do hospedeiro. Deste modo, nota-se que miRNAs produzidos pelo vírus pode atuar tanto na regulação de RNAm viral quanto no RNAm produzido pelo hospedeiro. Com relação aos miRNAs da célula, eles atuam em seu RNAm alvo, porém diante de uma infecção podem regular os transcritos virais (retirado de SCARIA et al., 2006).

Como os miRNAs estão intimamente relacionados com a infecção viral, avanços no entendimento dessa complexa interação podem se tornar marcadores prognósticos ou até uma futura terapia (MARQUEZ & MCCAFFREY, 2008). Tendo em vista essa perspectiva, programas computacionais (algoritmos) vêm sendo bastante utilizados para auxiliar nas pesquisas relacionadas com miRNAs e seus possíveis alvos (BENTWICH, 2005; MAZIÈRE & ENRIGHT, 2007). Esses algoritmos são *softwares* que realizam uma triagem dos possíveis alvos entre RNAm e miRNAs. Essa

predição de alvos por meio de ferramentas de Bioinformática é possível devido aos “requisitos” que o miRNA deve apresentar para se ligar ao seu alvo. Um deles, bastante estudado, é a região da “semente”, a qual compreende a ligação dos oito primeiros nucleotídeos da região 5’ do miRNA com a 3’ UTR do RNAm, sendo imprescindível uma boa complementaridade entre as mesmas para que ocorra a inibição da tradução do RNAm alvo, como mostrado por Brennecke et al. (2005). Outra característica considerada nestes algoritmos é a energia livre (Mfe) do *duplex* formado entre o miRNA e seu RNAm alvo. Essa ligação deve apresentar valores baixos para que seja estável em condições biológicas (KERTESZ et al., 2007).

1.2 Vírus Linfotrópico de Células T Humanas (HTLV)

1.2.1 Aspectos Gerais

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) foi descoberto em 1980, e foi o primeiro retrovírus isolado de humanos associado a uma doença (POIEZ et al., 1980). Posteriormente, foram descobertos novos integrantes desta família classificados como: HTLV-1 (POIEZ et al., 1980), HTLV-2 (KALYANARAMAN et al., 1982) e mais recentemente, dois novos tipos moleculares: HTLV-3 (MAHIEUX & GESSAIN, 2005; WOLFE et al., 2005) e HTLV-4 (WOLFE et al., 2005). Esses dois novos retrovírus foram descobertos em populações do sul de Camarões que têm contatos com primatas não-humanos. Entretanto, ainda não se demonstrou as formas de transmissão e se são capazes de desencadear doenças em seus portadores (WOLFE et al., 2005).

Dentre estes descritos, o HTLV-1 é o mais disseminado e estima-se que 10 a 25 milhões de pessoas estejam infectadas por ele no mundo (PROIETTI et al., 2005), sendo que entre indivíduos doadores de sangue no Brasil a quantidade de pessoas infectadas é de 2,5 milhões (CATALAN-SOARES et al., 2005). Os meios de transmissão do HTLV entre indivíduos são: materno-infantil (incluindo o aleitamento); parenteral e sexual (KAJIYAMA et al., 1986; MURPHY et al., 1989). Assim, os testes de triagem para HTLV-1/HTLV-2 foram introduzidos em bancos de sangue de vários países, sendo obrigatório no Brasil (Ministério da Saúde 1376/1993).

A infecção pelo HTLV acontece pelo contato célula-célula e a infecção por vírus livres é aparentemente ineficiente. Dessa forma, a transmissão do HTLV-1 ocorre pela transferência dos *vírions* por meio de sincícios formados entre células infectadas e não-infectadas (IGAKURA et al., 2003). Sabe-se que o HTLV pode infectar uma variedade de células, uma vez que seu receptor é o transportador de glicose tipo-1 (GLUT-1), que está presente em vários tipos celulares (MANEL et al., 2004). Porém, existe predileção por células T CD4⁺, uma vez que a eficiência da entrada depende de Proteoglicanas de Heparan Sulfato (HSPGs), moléculas que atuam como co-receptores presentes em grande quantidade na superfície de linfócitos T *helper* (JONES et al., 2006).

1.2.2 Manifestações Clínicas Associadas ao HTLV-1

Dentre as principais manifestações clínicas causadas pelo HTLV-1, destacam-se: a leucemia/linfoma das células T do adulto – ATLL (YOSHIDA et al., 1980) e a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical – HAM/TSP (GESSAIN et al., 1985). Outros processos inflamatórios também foram associados ao HTLV-1, dentre eles: dermatite infecciosa, uveíte, artropatia associada ao HTLV-1 entre outras (LAGRENADE et al., 1990; MOCHIZUKI et al., 1993; NISHIOKA et al., 1989). Os eventos que levam o portador do HTLV-1 a permanecer no estado assintomático ou desenvolver alguma manifestação clínica ainda não estão totalmente elucidados. Porém, a carga proviral, invasão de células infectadas a outros compartimentos e efetividade da resposta imune durante toda infecção, são considerados fatores importantes para determinar o risco de desenvolver as doenças associadas (MANNS et al., 1999; MONTANHEIRO et al., 2005; AHUJA et al., 2006). Dentre estes aspectos, polimorfismos em genes relacionados à produção de interleucinas (GADELHA et al., 2008) e mutações no receptor *DC-sign* (KASHIMA et al., em publicação) demonstram que fatores do hospedeiro devem ser analisados em indivíduos infectados pelo HTLV-1.

1.2.3 Características estruturais do HTLV-1

O HTLV-1 tem características similares a outros retrovírus, como seu ciclo de replicação, o qual é composto pelas etapas clássicas de transcrição reversa do RNA e integração deste ao genoma do hospedeiro (GOFF, 2001). Além disso, possui duas fitas simples de RNA idênticos no seu genoma, o qual

apresenta os genes estruturais *gag*, *pol* e *env*, além de dois genes regulatórios *tax* e *rex*, os quais formam a região *pX*, esquematizado na Figura 3. O HTLV-1 possui DNA proviral composto por aproximadamente 9000 pares de bases (bp) (SEIKI et al., 1983). Suas extremidades são flanqueadas por duas regiões repetidas, chamadas *long terminal repeats* (LTR), cujas sequências são essenciais para integração do DNA proviral no DNA do hospedeiro, bem como na regulação transcricional do genoma do HTLV-1. A região do gene *gag*, é traduzida para originar as proteínas Gag, compostas por: proteína da matriz p19; proteína do capsídeo (p24); proteína do nucleocapsídeo (p15). A região *pol* é responsável pela codificação da transcriptase reversa e da integrase. As proteínas do envelope viral, por sua vez, são transcritas a partir da região *env*.

Figura 3. Genoma do HTLV-1 e proteínas codificadas. O HTLV-1 contém genes estruturais comuns a outros retrovírus (*gag*, *pol* e *env*), mas também possui a região *pX*, que codifica as proteínas regulatórias Rex e Tax.

A região *pX* do genoma viral produz um RNAm com pelo menos 4 fases de leitura aberta (ORFs), dessa forma, esta região do genoma do HTLV-1 é responsável pela produção de um único RNAm que é traduzido em duas proteínas regulatórias: Tax e Rex (GRASSMANN et al., 1992). Essas proteínas regulam o genoma viral e podem interferir com as funções da célula hospedeira

em diferentes níveis, afetando a transcrição e tradução de vários genes celulares (FRANCHINI & STREICHER, 1995; FERREIRA Jr et al., 1997). A proteína Rex é responsável pelo controle dos RNAm virais, fazendo com que haja favorecimento da tradução. Dessa forma, é indispensável para a multiplicação viral e regulação da fase latente do ciclo celular do HTLV-1 (YOUNIS & GREEN, 2005).

1.2.4 Proteína viral Tax

A proteína Tax é uma fosfoproteína que modula a expressão de genes virais e do hospedeiro ao interagir com fatores de transcrição e proteínas que estão envolvidas em modelagem de cromatina. Dentre vários fatores que podem ser regulados pela Tax, os mais estudados são os pertencentes à família NF- κ B.

Em mamíferos, esta família de fatores de transcrição é composta por cinco membros (RelA, RelB, c-Rel, NF- κ B1 e NF- κ B2), que formam vários complexos diméricos que podem ativar ou reprimir diversos genes alvos. No estado inativo, esses dímeros estão inertes no citoplasma devido à ligação com proteínas chamadas I κ Bs. Quando um gene precisa ser transcrito ocorre a fosforilação destes inibidores pela I κ B quinase, seguido por ubiquitinação e degradação. Por fim, o fator NF- κ B sofre translocação nuclear e os genes passam a ser expressos. A proteína Tax pode ligar-se nestas proteínas I κ Bs e fazer com que haja degradação das mesmas. Como consequência, ocorre liberação e ativação do NF- κ B (revisado por BOXUS et al., 2008). Logo, a proteína Tax tem capacidade de interferir em diferentes níveis, pois atua inibindo a atividade de proteínas reguladoras do ciclo celular, o que leva à: promoção da proliferação celular, acumulação de DNA danificado e inibição da apoptose (ASQUITH & BANGHAM, 2008).

Assim, ocorre um aumento da quantidade de linfócitos T CD4⁺ infectados circulantes, que devido à produção de moléculas de adesão favorecem a migração deste linfócito para o sistema nervoso central, o que levaria ao desenvolvimento da mielopatia (GRANT et al., 2002). A hipótese mais aceita para o desencadeamento da doença é a chamada de “dano colateral”, a qual sugere que o aumento da expressão de Tax conduziria o reconhecimento dos imunopeptídeos ligados fortemente no HLA A201, estimulando uma resposta

exacerbada dos linfócitos T citotóxicos (CTLs). Uma vez ativadas ocorreria seleção dos clones de linfócito T CD8⁺ com maior avidéz na ligação HLA A201/Tax11-19. Assim, as CTLs quando atacam os linfócitos T CD4⁺ infectados presentes no líquido geram excesso de produção de citocinas e quimiocinas. Como consequência, ocorreria uma resposta inflamatória exacerbada que levaria à necrose de células nervosas do sistema nervoso central (JACOBSON, 2002). Tax é um alvo antigênico de linfócitos T citotóxicos (CTLs) na resposta contra o HTLV-1 (KANNAGI et al., 1992), o que faz com que sua alta expressão seja um fator prognóstico para o desenvolvimento de HAM/TSP (ASQUITH et al., 2005).

Apesar dos avanços nos estudos sobre a participação da proteína Tax em alterações celulares e sobre mecanismos moleculares do HTLV-1, existem poucos relatos de como ocorre o controle da expressão desta proteína nas células infectadas. Dessa forma, os miRNAs podem apresentar um papel importante no processo infeccioso, uma vez que são potentes reguladores pós-transcricionais. Recentemente, dois estudos foram realizados para correlacionar miRNAs e pacientes portadores do HTLV-1 (YEUNG et al., 2008; PICHLER et al., 2008). Ambos descreveram miRNAs envolvidos no processo de imortalização celular, a partir de amostras obtidas de linhagens celulares e indivíduos que possuem ATLL. Até o momento, não existem relatos que associem miRNAs a outras manifestações clínicas causadas pelo HTLV-1. Deste modo, comparar a expressão dos miRNAs em pacientes portadores de HAM/TSP e observar se existe semelhança ou distinção entre a expressão da proteína viral Tax, pode auxiliar na elucidação de aspectos como período de latência do vírus e se o indivíduo infectado desenvolverá patologias associadas ao HTLV-1.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliação da expressão de miRNAs em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes infectados pelo HTLV-1 e controles sadios.

2.2 Específicos

- Mapeamento de alvos de miRNAs humanos no genoma do HTLV-1, especificamente na região do gene *tax*, utilizando ferramentas de Bioinformática;
- Comparação dos sítios de conservação relacionados à região-alvo dos miRNAs entre os diferentes subtipos de HTLV-1;
- Avaliação do nível de expressão destes miRNAs em PBMC humanos utilizando a metodologia de PCR em tempo real;
- Associação da carga proviral e expressão da proteína Tax com os miRNAs.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

A estratégia experimental foi realizada de acordo com a Figura 4.

Figura 4. Fluxograma da estratégia experimental. Cada procedimento contém o item que está descrito posteriormente.

3.1 Análises *in silico*

3.1.1 Detecção *in silico* de miRNAs que possuem alvo no gene *tax* do HTLV-1

Com o objetivo de detectar potenciais miRNAs com alvos na sequência do gene *tax* do HTLV-1 foram utilizados os algoritmos *miRanda* (ENRIGHT et al., 2003) e *RNAhybrid* (REHMSMEIER, 2004).

Para a utilização do algoritmo *miRanda*, é necessário o download do programa e a criação manual de dois arquivos de leitura (com extensão *txt*), que são utilizados pelo mesmo. O primeiro, denominado de *File 1*, deve conter as sequências no formato FASTA de todos os miRNAs maduros que serão utilizados. Estes foram obtidos pela base de dados [<http://miRNA.sanger.ac.uk>], sendo que para análise inicial 400 miRNAs foram utilizados. O segundo, denominado de *File 2*, deve conter a sequência do DNA utilizada como alvo, também em formato FASTA. Neste estudo foi utilizada a região *tax* do HTLV-1, obtida do site [www.ncbi.nlm.nih.gov]. Após a criação dos arquivos, roda-se o programa de forma que a sequência contida no *File 1* seja escaneada contra o *File 2* e os possíveis alvos sejam reportados. Imediatamente, o algoritmo realiza um segundo passo, que consiste em ranquear esses alvos conforme valores de *Score* (baseados na ligação com a semente) e de *Mfe* que são pré-estabelecidos pelo programa, ou que podem ser alteradas pelo usuário.

O outro algoritmo utilizado foi *RNAhybrid*, o qual está disponível *on-line* e permite que o usuário faça uma varredura contra o gene de interesse (que não deve possuir mais que 700 pb). Cada análise permite que somente um miRNA seja escaneado contra o alvo. A velocidade da análise é dependente da velocidade da conexão com a internet e esse algoritmo também classifica os potenciais alvos conforme valores pré-estabelecidos de energia-livre (*Mfe*) e ligação com a semente, sendo que ambos podem ser alterados pelo usuário. A tabela 1 resume os métodos que cada *software* utiliza para suas análises. Nas análises realizadas pelos dois softwares os parâmetros foram alterados para que a *Mfe* fosse menor que -15kCal/mol e que a ligação com a semente tivesse pelo menos 5 nucleotídeos pareados.

Tabela 1 – Resumo dos softwares utilizados para análise de Bioinformática.

Método	Análise preferencial	Modo de análise	Desvantagens
<i>miRanda</i>	complementaridade	Download	Não existe a opção de observar o desenho bidimensional do <i>duplex</i> formado entre miRNA e RNAm
<i>RNAhybrid</i>	termodinâmica	<i>On-line</i>	Só é possível avaliar um miRNA por vez contra o gene de interesse

3.1.2 Comparação da conservação das regiões-alvo no gene *tax* entre os diferentes subtipos de HTLV-1

Diferentes subtipos de HTLV-1 sob os números de acessos: AF139170, AF259264, NC001436, D13784, AF033817 e U19949, disponíveis no *site* [www.ncbi.nlm.nih.gov] foram alinhados utilizando o software *DAMBE* (XIA & XIE, 2001) e posteriormente analisados no programa *Mega 3.1* (KUMAR et al., 2004) para observar a existência de mutações nas regiões consideradas como potencial alvo dos miRNAs humanos.

3.2 Casuística

Foram colhidas 23 amostras de sangue periférico de pacientes infectados pelo HTLV-1 (diagnosticados e acompanhados no HC/FMRP – USP). Desses, 16 indivíduos são do sexo feminino e sete do sexo masculino, com idade média de 59 anos (mínima de 21 anos e máxima de 64 anos). Dez são portadores assintomáticos do vírus (HAC) e 13 apresentam HAM/TSP (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização demográfica de controles e pacientes.

ID	SEXO	IDADE (Anos)
CT01	F	54
CT09	F	26
CT10	F	54
CT11	M	32
CT13	M	52
CT14	M	28
CT15	F	29
CT16	M	57
CT18	F	45
CT19	M	44
CT20	F	47
CT21	F	42
CT22	F	42
CT23	F	51
CT24	F	59
CT25	M	64
CT26	F	62
CT27	F	32
CT28	M	44
CT29	F	45
CT30	F	51

HAC: Pacientes assintomáticos infectados pelo HTLV-1; HAM: Pacientes que apresentam HAM/TSP; CT: Indivíduos controle; F: Indivíduos do sexo feminino; M: Indivíduos do sexo masculino.

Tabela 2 – Continuação.

ID	SEXO	IDADE (Anos)
HAC 01	F	52
HAC12	F	51
HAC13	F	42
HAC15	M	53
HAC16	F	55
HAC19	F	33
HAC20	M	45
HAC21	M	46
HAC22	M	61
HAC23	F	46
HAM01	F	55
HAM02	F	34
HAM05	F	61
HAM08	M	47
HAM09	M	64
HAM10	F	61
HAM13	F	49
HAM14	F	61
HAM15	F	62
HAM16	M	54
HAM17	F	55
HAM18	F	48
HAM19	F	42

HAC: Pacientes assintomáticos portadores do HTLV-1; HAM: Pacientes portadores da HAM/TSP; CT: Indivíduos controle; F: Indivíduos do sexo feminino; M: Indivíduos do sexo masculino.

O grupo controle (CT) foi composto por 21 indivíduos normais, não portadores de doenças infecciosas, sendo 14 indivíduos do sexo feminino e sete indivíduos do sexo masculino, com média de idade de 50 anos (mínima de 26 anos e máxima de 64 anos), conforme pode ser observado na Tabela 1. Como os pacientes apresentam perfil étnico variado, a ascendência racial dos indivíduos não foi considerada relevante para este estudo.

3.2.1 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto no dia 06 de dezembro de 2006, sob o nº 12352/06 (**ANEXO A**). As amostras de sangue foram colhidas somente após a assinatura, pelos pacientes ou indivíduos-controle, do termo de consentimento livre e esclarecido (**ANEXOS B e C**).

3.3 Sorologia e PCR para HTLV-1 e 2

Todas as amostras colhidas de pacientes foram submetidas ao teste sorológico por ensaio imunoenzimático - *ORTHO HTLV-1/2 Ab-capture ELISA test system* (Ortho Clinical Diagnostics INC., Raritan, New Jersey, EUA). Os procedimentos de reação e os resultados foram conduzidos e avaliados no Laboratório de Sorologia do Hemocentro de Ribeirão Preto, conforme as instruções do fabricante.

Para a reação de PCR, considerada como teste confirmatório, utilizou-se os reagentes e os procedimentos padronizados pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto.

3.4 Leucograma e contagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺

A contagem global do número de leucócitos no sangue periférico foi determinada através de hemograma completo realizado de maneira automatizada no equipamento *COULTER[®] A^C.T diff* (Beckman Coulter Inc, Fullerton, Califórnia, EUA). A contagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se o citômetro *FACSort* (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA) e o reagente *TriTEST CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PerCP* com *TruCOUNT* (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA). Os tubos *TruCOUNT* contêm um material liofilizado de partículas fluorescentes, que em contato com a amostra se dissolve, liberando número conhecido de partículas. Esse sistema permite a contagem absoluta de células positivas para os marcadores, comparando os eventos de células positivas com os eventos de partículas fluorescentes.

Para a marcação, foi utilizado um tubo *TruCOUNT* para cada amostra. Ao tubo foram adicionados 20 µL do reagente *TriTEST CD4/CD8/CD3* e 50 µL de sangue total, tampando-se e homogeneizando-se bem. A amostra foi incubada durante 15 minutos no escuro e à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 450 µL de solução de lise *FACS (1X)*, homogeneizando-se e incubando-se durante 15 minutos nas mesmas condições anteriores. Neste momento, as subpopulações celulares eram analisadas por meio do software *MultiSET* (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA), com aquisição de 15.000 eventos totais.

3.5 Isolamento de células mononucleares por densidade

Amostras de 20 mL de sangue periférico venoso de indivíduos sororeagentes para HTLV-1 e de indivíduos saudáveis foram colhidas na presença de heparina sódica. Deste volume, 5 mL do sangue total foram utilizados para extração de DNA

(item 3.5.1), enquanto os 15 mL restantes foram utilizados para separação de população celular por centrifugação em gradiente de densidade. Para isto, as amostras foram diluídas na proporção 1:1 (v/v) em PBS 1X e aplicadas cuidadosamente em tubos de polipropileno de 50 mL, contendo 15 mL de Ficoll-Paque® (GE Healthcare, Uppsala, Uppsala län, Suécia). Os tubos foram centrifugados a $500 \times g$ por 30 minutos a temperatura ambiente para obtenção da camada de PBMC. As células presentes na interfase plasma-Ficoll-Paque® foram cuidadosamente coletadas, lavadas duas vezes a $200 \times g$ com PBS (1X), ressuspensas em 1 mL de PBS (1X) e contadas em câmara de Neubauer, utilizando corante Turk. Da quantidade total de células obtidas, 1×10^7 células foram preservadas em Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), e as células restantes criopreservadas para posterior análise por citometria de fluxo (item 3.11) em 1 mL de soro bovino fetal inativado (Hyclone, Logan Utah, EUA) contendo DMSO a 10% (v/v) (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha).

3.5.1 Extração e quantificação de DNA

Para a obtenção do DNA genômico, utilizou-se o kit *Super Quick Gene Isolation* (Analytical Genetic Testing Center – AGTC, Denver, Colorado, EUA). As células sanguíneas, obtidas de 5 mL de sangue total, foram separadas por centrifugação a $1400 \times g$ por 10 minutos e o *buffy coat* coletado em tubo de polipropileno de 15 mL estéril. O plasma foi estocado a -20°C . A partir do *buffy coat*, adicionou-se 10 mL de tampão para lise dos glóbulos vermelhos, homogeneizou-se por 15 minutos em temperatura ambiente, seguido de centrifugação a $1400 \times g$ por 20 minutos. O procedimento foi repetido duas vezes e, posteriormente, foi adicionado o tampão de lise dos glóbulos brancos, cuja mistura foi incubada em banho-maria por 30 minutos a 55°C . Em seguida, adicionou-se 200 μL de SDS a 10% (m/v) e 500 μL de reagente precipitante de proteínas (Analytical Genetic Testing Center – AGTC, Denver, Colorado, EUA) com agitação vigorosa por 30 segundos. Esta reação foi novamente incubada a 55°C por 15 minutos e centrifugada a $1400 \times g$ por 20 minutos. Após centrifugação, recolheu-se o sobrenadante e a este foi adicionado duas vezes o volume obtido de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha). O DNA precipitado foi coletado em tubo de 1,5 mL estéril e, após completa evaporação do etanol, ressuspenso em 200 μL de água estéril tipo I. Sua estocagem foi realizada -20°C .

A quantificação e a determinação da pureza do DNA extraído foi realizada por espectrofotometria em comprimentos de onda ultravioleta de 260 nm e 280 nm (Spectronic 1201, Milton Roy), a partir da diluição das amostras em água tipo I estéril numa proporção de 1:200 (v/v).

3.5.2 Extração e quantificação de RNA

Às células mononucleares foi adicionado Trizol® na proporção de 1:4 (v/v) e 5 µL de glicogênio a 20 mg/mL (USB, Cleveland, Ohio, EUA). Estas foram homogeneizadas e incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente para dissociação nucleoproteica. Adicionou-se 200 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha) seguido por agitação em vórtex durante 15 segundos e incubação por 15 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a $12000 \times g$, a 4°C, recolhendo-se a fase aquosa. A fase aquosa foi recolhida e 500 µL de isopropanol gelado (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha) foram adicionadas a esta. Para precipitação do RNA o material foi incubado a -20°C *overnight*. Após esse período, a amostra foi centrifugada durante 10 minutos a $12000 \times g$ a 4°C. O precipitado foi lavado duas vezes com 1000 µL de etanol 70% (v/v), centrifugando-se em seguida por 5 minutos a $7500 \times g$, a 4°C. O precipitado, após secagem em tubo aberto, foi dissolvido em 20 µL de H₂O DEPC e estocado a -80°C.

A integridade das amostras de RNA foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). Após eletroforese a 100 volts durante 40 minutos, o gel foi corado com brometo de etídeo e a integridade das bandas 28S e 18S de RNA foram visualizadas em transiluminador de luz ultravioleta e fotografadas.

3.6 Cultivo e expansão da linhagem MT-2

A linhagem celular MT-2 é um linfoblasto isolado de indivíduo portador de ATLL, que contém o HTLV-1 e expressa proteína Tax (número de catálogo 93121518/ECACC - HPACultures, Salisbury, Wiltshire, UK). Esta linhagem foi cultivada em garrafas de 15 cm² (Greiner Bione, Frickenhausen, Baden-Württemberg, Alemanha) com 15 mL de meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) suplementado com soro fetal bovino inativado a 10 % (v/v) (Hyclone, Logan Utah, EUA); 100 U/mL de penicilina; 100 U/mL de

estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA). As culturas foram mantidas em incubadoras *Steri-cult 200 Thermoform* (Forma Scientific, Marietta, Ohio, EUA) a temperatura de 37°C, 5 %CO₂ e 85% de umidade relativa do ar. Após a expansão da cultura, as células foram coletadas em tubos de polipropileno de 15 mL e lavadas com tampão PBS (1X) por centrifugação a 200 × *g* durante 10 minutos, ressuspensas em 1 mL de PBS (1X) e contadas em câmara de Neubauer, na presença do corante Turk's.

3.7 Quantificação absoluta da carga proviral (CPV) do HTLV-1 por PCR em Tempo Real

Para esse experimento de PCR Quantitativo em Tempo Real utilizou-se o kit *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Acrescentou-se na reação 6,25 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 5 µM de *primer forward*, 5 µM de *primer reverse* e 5 µM de sonda marcada com o fluorocromo FAMTM (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). O desenho de *primers* utilizados para o gene alvo está descrito na Tabela 3 (MILEY et al., 2000). Para gene endógeno utilizou-se 5,0 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix* e 0,5 µL de sonda para o gene da β-actina (*TaqMan® Gene Expression Assays – Hs03023880_g1*) marcado com o fluorocromo FAMTM (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

Para construção da curva padrão utilizou-se a linhagem MT-2 (item 3.6), que contém 2,4 cópias do gene *tax*, por célula (ALBRECHT et al., 1998). A partir desse dado, utilizou-se uma quantidade conhecida de células, que após a extração e quantificação de seu DNA, foi possível realizar diluições seriadas para conter: 10⁵, 10⁴, 10³, 10² e 10¹ cópias de gene/µL, respectivamente. Para as amostras dos pacientes um total de 200 ng de DNA genômico foi utilizado na reação. Todas as diluições da curva-padrão e as amostras dos pacientes foram testadas em duplicata.

A reação foi submetida aos ciclos de amplificação: 1 ciclo de 50°C por 2 minutos, 1 ciclo de 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos/60°C por 1 minuto, no equipamento *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

Tabela 3 – Seqüência de *primers* utilizados para qRT-PCR.

Gene	Primers	Seqüência (5' - 3')
tax	HTLV F5	CGG ATA CCC IGT CTA CGT GTT T
	HTLV R4	CTG AGC IGA IAA CGC GTC CA
	Sonda	R-ATC ACC TGG GAC CCC ATC GAT GGA-Q

R indica o fluorocromo FAM e Q indica o local de inserção do *quencher*

3.7.1 Cálculo da quantificação da carga proviral (CPV)

Durante a fase exponencial da amplificação, a curva se torna linear e o *cycle threshold* (Ct) pode ser estabelecido. Isso significa que a cada ciclo, o dobro de produto é formado e quando realizadas diluições seriadas são mantidas diferenças proporcionais entre os Cts. Nesse experimento, as diluições seriadas foram realizadas na base 10 e os valores de Ct obtidos devem possuir uma diferença de aproximadamente 3,3 ciclos. Em decorrência dessa proporção foi construída a curva padrão por regressão linear para a média de amplificação dos genes β -actina e *tax*.

A partir da média da quantidade destes genes utilizou-se a fórmula abaixo, para a obtenção da carga proviral.

$$\text{CPV: } \frac{\text{n}^\circ \text{ de cópias de } tax}{\text{n}^\circ \text{ de cópias de } \beta\text{-actina}} \times 2 \times 10.000 \text{ células}$$

3.8 Extração de proteínas pelo método de Trizol®

Após a extração de RNA das amostras, a fase orgânica foi acrescida de 400 μ L de etanol absoluto gelado (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha) e estas foram mantidas em gelo por 3 minutos. Após esse tempo, a amostra foi centrifugada a $2000 \times g$ por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 2 mL e imediatamente adicionou-se 1,5 mL de isopropanol gelado (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha). O tubo foi homogeneizado por suaves inversões até a precipitação das proteínas totais, por um tempo máximo de 10 minutos, e centrifugado a $12000 \times g$ por 10 minutos a 4°C, para desprezar o sobrenadante. Ao

precipitado formado foram realizadas 3 lavagens, cada uma consistiu na adição de 2 mL de solução alcoólica de hidrocloreto de guanidina 0,3M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), seguido por repouso de 20 minutos a temperatura ambiente para cada lavagem. Ao término de cada lavagem, o tubo foi centrifugado a $7500 \times g$ por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante sempre desprezado totalmente. Após a última lavagem, o precipitado foi ressuspenso em 2 mL de etanol absoluto gelado (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha) e novamente incubado por 20 minutos a 4°C . Decorrido o tempo de incubação, o *pellet* foi centrifugado $7500 \times g$ por 5 minutos a 4°C e seco em centrífuga a vácuo modelo *SpeedVac®Plus* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) por 10 minutos. Ao precipitado seco, adicionou-se 200 μL de SDS a 1% (m/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) e o tubo foi incubado em banho-maria a 50°C por 16 horas. Após esse período, pode ser observada a diluição total do material, o qual foi transferido para um tubo limpo e estocado a -80°C .

3.9 Quantificação de Proteínas Totais

A quantificação de proteínas totais foi realizada em microplacas utilizando o kit *BCA Protein Assay Kit®* (Pierce, Rockford, Illinois, EUA), conforme especificações do fabricante. Para a construção da curva-padrão realizou-se diluição seriada a partir de uma solução-padrão fornecida com o kit, composta por BSA 2 mg/mL. Foram utilizadas as seguintes concentrações: 2 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125mg/mL; 0,0625 mg/mL. O procedimento seguinte consistiu pipetar em cada poço as soluções em duplicata: 10 μL de cada diluição da curva-padrão; 10 μL de amostra; 10 μL de solução SDS a 1% (utilizada como branco). Em seguida, foram adicionados 200 μL de BCA-W® em cada poço. A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos e posteriormente resfriada em gelo. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 562 nm e o leitor de microplacas utilizado foi *VersaMaxPLUS®* (MDC, Sunnyvale, Califórnia, EUA).

3.10 Análise da expressão da proteína Tax por “Western blot”

Foi realizada a quantificação da proteína Tax pela técnica de *Western blot*, a partir de proteínas totais extraídas de células mononucleares dos pacientes infectados pelo HTLV-1.

3.10.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Essa técnica foi realizada em condições desnaturantes. O gel de empilhamento foi confeccionado a 5% e o gel de separação a 12%, ambos contendo SDS a 0,1% (m/v). Foram utilizadas 30 µg de proteínas totais, por amostra, que foram extraídas e quantificadas conforme itens 3.8 e 3.9. O preparo destas amostras para aplicação no gel de poliacrilamida foi feito por meio da adição de 5 µL de tampão de amostra, seguido por aquecimento a 100°C por 5 minutos. – Tampão de Amostra: Tris-HCl 187mM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), SDS a 2% (m/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), azul de bromofenol a 1,0% (m/v) (Sigma-Chemical, Saint Louis, Missouri, EUA), glicerol a 27% (v/v) (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha); β-mercaptoetanol a 5% (v/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA); água estéril tipo I (q.s.p. 10 mL). Após o preparo, as amostras e 6 µL do marcador de peso molecular *Kaleidoscope Prestained Standards*® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA) foram aplicados no gel e submetidos à eletroforese em tampão de corrida Tris-Glicina (1X) a 100V por aproximadamente três horas, utilizando o sistema *PowerPac 3000* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA).

– Tampão Tris-Glicina– Tris 2,5mM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA); Glicina 19,2mM (USB, Cleveland, Ohio, EUA); SDS a 0,1% (m/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), água estéril tipo I (q.s.p. 1 Litro). Acertou-se o pH da solução para 8,3.

3.10.2 Western blot

Após o término da eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF *Hybond-P*® (GE HealthCare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, Inglaterra) em tampão de transferência por duas horas e meia, a 350 mA, utilizando o sistema *PowerPac 3000* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, EUA).

– Tampão de transferência– Tris 25mM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA); glicina 19,2mM (USB, Cleveland, Ohio, EUA); metanol 20% (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha), água estéril tipo I (q.s.p. 1 Litro). Acertou-se o pH da solução para 8,3 antes da adição do metanol.

Terminada a transferência, a membrana foi bloqueada *overnight*, em 5% de leite desnatado e 0,1% de azida sódica diluídos em TBS-T. Após esse período, procedeu-se a incubação por 12 horas com os anticorpos primários diluídos em

TBS-T, anti-tubulina policlonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Califórnia, EUA) na concentração 1:2500 e monoclonal anti-Tax na concentração de 1:500 (Abcam, Cambridge, Massachusetts, EUA). Posteriormente, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T, 10 minutos cada. Após as lavagens, foi adicionado anticorpo anti-IgG de camundongo na concentração de 1:1000 ou anticorpo anti-IgG de coelho 1:3000, ambos marcados com peroxidase (GE HealthCare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, Inglaterra).

– TBS-T– Tris 10mM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA); cloreto de sódio padrão analítico 150 mM (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha); Tween-20[®] a 0,1% (v/v) (USB, Cleveland, Ohio, EUA); água estéril tipo I (q.s.p.1 Litro). Acertou-se o pH da solução para 7,5 (Sigma-Chemical, Saint Louis, Missouri, EUA).

Foi realizada lavagem da membrana da mesma forma que se procedeu com o anticorpo primário. Em seguida, a membrana foi imersa em *ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE HealthCare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, Inglaterra), conforme especificações do fabricante. A revelação foi realizada em sala escura, utilizando filme revelador *CL-X Posure Film*[®] (GE HealthCare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, Inglaterra).

As bandas detectadas por quimioluminescência foram quantificadas por densitometria através do programa *ImageJ 1.41*, disponível para download [<http://rsb.info.nih.gov/ij>]. Os resultados estão expressos pela razão da IDV (*integrated density value*) da proteína investigada pela IDV da proteína endógena (tubulina).

3.11 Análise da expressão da proteína Tax por citometria de fluxo

Este ensaio foi realizado segundo descrito por Asquith et al. (2005), em sala de Biossegurança nível 3, utilizando ao menos 1×10^6 de células PBMC congeladas, por experimento. Para as lavagens descritas a seguir foi utilizado meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) suplementado com soro fetal bovino inativado a 10% (v/v) (Hyclone, Logan Utah, EUA). As células foram descongeladas, lavadas e ressuspensas em placas de seis poços contendo 2 mL de meio acrescido de Concanamicina A (20nM) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). Posteriormente estas foram mantidas por 12 horas em incubadoras *Steri-cult 200 Thermoform* (Forma Scientific, Marietta, Ohio, EUA) a temperatura de 37°C, 5% CO₂

e 85% de umidade relativa do ar. As células foram lavadas e ressuspensas em 1 mL de meio para contagem em câmara de Neubauer com corante vital azul de Tripan. Após analisar a viabilidade, estas foram distribuídas em placa de 96 poços com fundo cônico, contendo $2,5 \times 10^5$ células viáveis por poço.

Com exceção do primeiro poço que foi utilizado como controle e apresentava células sem nenhuma marcação, aos demais foi adicionado 5 μ L de anticorpo anti-CD4 marcado com fluorocromo PC5 (Beckman-Coulter Inc., Fullerton, Califórnia, EUA). A placa foi incubada a 4°C por 20 minutos e decorrido o tempo de incubação, esta foi lavada para retirada das ligações inespecíficas. Posteriormente, o precipitado foi ressuspense em 100 μ L de PBS 1X e acrescido de paraformaldeído 4% (v/v) e 100 μ L de HEPES 250 mM (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) para formalização das amostras. A solução ficou a temperatura ambiente por 20 minutos em contato com as células e estas foram centrifugadas a $1000 \times g$ por 3 minutos. As células foram lavadas com PBS 1X contendo soro de cabra 4% (v/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA). O sobrenadante foi descartado e ao precipitado de células adicionou-se 100 μ L de PBS 1X e 0,1% de Triton X (v/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) para permeabilização celular. A solução foi deixada em contato com as células por 7 minutos e posteriormente estas foram lavadas com 100 μ L de PBS 1X contendo soro de cabra 4% (v/v) a $600 \times g$ por 3 minutos.

Ao término da lavagem, adicionou-se 100 μ L do anticorpo primário Lt-4, diluído 1:1000 em PBS 1X contendo soro de cabra 4% (v/v). A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e lavada com PBS 1X contendo soro de cabra 4% (v/v) a $600 \times g$ por três minutos para retirada dos anticorpos que não se ligaram. O volume de 100 μ L de anticorpo anti-IgG3 de camundongo diluído 1:1000 em PBS 1X contendo soro de cabra 4% (v/v) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), foi adicionado, inclusive ao poço utilizado como controle, e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, a placa foi lavada com PBS 1X contendo soro de cabra 4% (v/v) a $600 \times g$ por três minutos. O poço controle sem anticorpo primário foi utilizado para fazer a aquisição dos eventos. O anticorpo secundário é conjugado com o fluorocromo Alexa Fluor 488, que emite fluorescência no comprimento de onda de 530nm, captada pelo filtro do aparelho *DakoCytomation®* (Dako A/S, Glostrup, Dinamarca).

3.12 Validação dos miRNAs pela metodologia do PCR em Tempo Real

3.12.1 Transcrição reversa (RT)

Para esse experimento de RT, utilizou-se 2,5 ng de RNA total, 3,8 U de inibidor de RNase, água DEPC e os reagentes contidos no kit *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), conforme especificações do fabricante. Realizou-se a substituição do *random primer*® (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) pelo *stem-loop RT primer*® para cada miRNA maduro que foi analisado. A reação foi incubada a 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. A substituição pelo *stem-loop RT primer*® se faz necessária, para que o cDNA formado seja específico para cada microRNA maduro que se deseja analisar (Figura 5).

Figura 5. Esquema da transcrição reversa pela utilização de *looped RT primers*® (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). A ligação do *looped RT primer*® é específica para cada miRNA maduro, uma vez que é necessária a ligação entre este e os oito pares de base da região 3' do miRNA.

3.12.2 Reação de Amplificação

Para essa reação, utilizou-se o kit *TaqMan® microRNA assays Human* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). A preparação da mistura de reação foi realizada utilizando: 5 µL de reagente *TaqMan® Universal Master Mix (2X)*; 0,5 µL de sonda (20x) (específica para cada miRNA maduro e marcada com o fluorocromo FAM®); 0,5 µL de água reagente estéril Tipo I; cDNA obtido no item 3.12.1 diluído 1:4 (v/v).

A reação foi submetida aos ciclos de amplificação: um ciclo de 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos/60°C por 1 minuto. Todas as reações foram testadas em duplicata e seu esquema está exemplificado na Figura 6.

A cada ciclo de reação, a *probe* é degradada devido a atividade 5'→3' exonuclease da enzima *Taq*. Com isso, a sonda emite fluorescência dada pelo fluorocromo FAM® (comprimento de onda de 520 nm) e captada pelo filtro A, do aparelho *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

Figura 6. Mecanismo de amplificação dos miRNAs por qRT-PCR. O miRNA, após o rompimento do *hairpin* formado na transcrição reversa, apresenta a fita transcrita maior do que a outra. Essa fita por possuir um número maior de nucleotídeos, faz com que seja possível anelar o *primer* reverso e a sonda. Devido a atividade 5'→3' exonuclease da enzima *Taq*, o fluorocromo é liberado a cada novo ciclo de amplificação e sua fluorescência é captada por um filtro específico, presente no aparelho.

3.12.3 Cálculo da Quantificação relativa

O nível da expressão dos miRNAs maduros foi calculado com base nos Cts obtidos, utilizando a equação matemática $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (SCHMITTGEN & KENNETH, 2001), com a derivação dessa fórmula constituída dos seguintes passos:

$$\Delta Ct = Ct \text{ do miR alvo} - Ct \text{ do RNU endógeno}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \text{mediana dos indivíduos controles (calibrador)}$$

3.13 *Análise estatística*

Para a avaliação dos pacientes quanto à carga proviral, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, comparando pacientes HAC vs. HAM.

A análise estatística empregada para a avaliação da expressão dos miRNAs foi realizada pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, quando comparado grupo CT vs. portadores do HTLV-1. Quando comparado grupo CT vs HAC vs. HAM, utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn.

Para associação da CPV com a expressão da proteína viral Tax utilizou-se o teste de correlação não-paramétrico de Spermann, esse mesmo método foi utilizado para correlacionar os miRNAs com CPV e miRNA com expressão da proteína viral Tax.

As análises acima foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Detecção “*in silico*” de miRNAs humanos que possuem alvos no gene *tax* do HTLV-1

O objetivo das análises utilizando ferramentas de Bioinformática foi de encontrar miRNAs humanos que possuíssem potenciais alvos na região regulatória *tax* do genoma do HTLV-1. Dentre os inúmeros algoritmos disponíveis para análise *in silico* foram escolhidos *miRanda* (ENRIGHT et al., 2003) e *RNAhybrid* (REHMSMEIER, 2004), os quais possuem parâmetros de análise diferentes entre si. Os dados gerados pelos softwares são apresentados conforme demonstrado na Figura 7.

Figura 7. Dados gerados pelos softwares *miRanda* (A) e *RNAhybrid* (B). Em ambos, está exemplificada a ligação do hsa-miR-222 com a mesma região da sequência do RNAm do gene *tax* do HTLV-1. Em vermelho, a ligação da região da “semente” e o valor de energia livre.

O algoritmo *miRanda* apresenta parâmetros pré-estabelecidos para as análises, os quais consistem de valores de *score* maiores que 100 e *Mfe* menores que -15 kCal/Mol. Para restringir quantitativamente o número de resultados, alteramos os parâmetros de análise para *score* maior que 120 e mantivemos o valor de *Mfe* inalterado. A sequência do genoma viral utilizado no *File 2* foi o subtipo 1a_Cosmopolita, depositado sob número de acesso no GenBank: AY563953.

A partir das análises iniciais utilizando *miRanda*, 450 miRNAs maduros foram escaneados contra o genoma de interesse. Deste total, apesar da utilização de parâmetros mais restritivos, foram encontrados cerca de 100 miRNAs que poderiam atuar como potenciais reguladores do gene *tax*. Devido ao grande número de miRNAs candidatos, realizou-se uma busca na literatura para que os resultados obtidos pudessem ser restringidos.

Além da revisão científica, nosso grupo de pesquisa isolou populações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺, por meio de coluna imuno-magnética. Foram selecionados quatro indivíduos para compor o grupo controle, quatro portadores assintomáticos (HAC) e quatro pacientes portadores de HAM/TSP (HAM). Para cada grupo foi confeccionado *pool* correspondente e este teve a expressão de 130 miRNAs analisados. A metodologia empregada foi o kit *TaqMan® MicroRNA Assays Human Panel Early Access Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Obtivemos como resultado diversos miRNAs diferencialmente expressos entre pacientes e controle. Dentre estes, buscou-se quais possuíam alvos no gene *tax* e que se encontravam diferencialmente expressos com *fold change* de pelo menos 2,5 vezes.

A análise conjunta (software *miRanda* versus painel de miRNA versus revisão da literatura) resultou em quatro miRNAs que possuíam alvo no gene de interesse (Tabela 4), os quais apresentaram *Mfe* variando de -30,47 a -20,30 kCal/Mol e pelo menos cinco nucleotídeos ligados a região 3'UTR do RNAm, ou seja, na região da semente. Com exceção do hsa-miR-125b, os outros apresentaram mais de uma região-alvo no gene *tax*.

Tabela 4 – Análise dos miRNAs contra o gene *tax* do HTLV-1 pelo algoritmo *miRanda*.

miRNA	Mfe(kCal/Mol)	Ligação miRNA e RNAm
hsa-miR-221	-21,42	3' CUUUGGGUCGUCUGUUACAUCGa 5' : : : 5' CAAGCCGGGCGG--ATGTAGCa 3'
	-21,08	3' CUUUGGGUCGUCUG--UUACAUCGa 5' : : : : 5' GTAGTCTAGTGGACCCTGGGGTAGCT 3'
hsa-miR-222	-30,47	3' CUCUGGG-----UCAUCG-----GUCUACAUCGa 5' : 5' GAGACCCCTGATACAAGCCGGCGGATGTAGCa 3'
	-23,51	3' CUCUGGGUCAUC--GGUCUACAUCGa 5' : : : : 5' tAG-TCTAGTGGACCCTGGGGTAGCT 3'
hsa-miR-125b	-20,36	3' CUCU-GGGUCAUC--GGUC--UACAUCGa 5' : : : 5' GAGATTCTGGGAGTTCCAGGAATGGGGCg 3'
	--25,62	3' aguGUUC--AAUCCC-AGAGUCCcu 5' 5' tgtCAAGGAATAGGGAGCTGAGGGg 3'
hsa-miR-149	-24,52	3' CCUCAC-----UUCUGUG---CCUCGGUCu 5' : : : : 5' GGGGTGCACTAAAAAACGGTGGGGCCGGt 3'
	-20,30	3' CC--UCACUUCUGUGCCUCGGUCU 5' : : : 5' GGACAGAAAAGGTCTGGGGCCTGA 3'
	-24,67	3' CCUCACUUCUGUGC--CUCGGUCu 5' : : 5' GGAG-GAAGGCAAGGTGAGTTGGg 3'
	-24,77	3' CCUCACUUCUGUG---C---CUCGGUCu 5' : : : 5' GGGGTAGAGACCCCTGATACAAGCCGGg 3'
	-23,00	3' CCUCACUUCUGUGCCUC--GGUCu 5' : : 5' GGTGGGAGGA-A-GGAGGTCCGGt 3'
hsa-miR-26a		não possui alvos
hsa-miR-29a		não possui alvos
hsa-miR-374		não possui alvos
hsa-miR-142-5p		não possui alvos
hsa-miR-648		não possui alvos

Observação: A primeira sequência de nucleotídeos é o miRNA maduro (3'→5') e a segunda é o RNAm alvo (5'→3').

Foi realizada uma segunda análise, através do software *RNAhybrid*. Nesta análise, observam-se que os valores de Mfe obtidos variaram entre -29,9 e -16,3 kCal/Mol e as ligações entre os *duplexes* formados mostram que existem pareamento de pelo menos cinco nucleotídeos na região da semente. Os miRNAs hsa-miR-26a, hsa-miR 29a, hsa-miR-374, hsa-miR-142-5p e hsa-miR-648 que não obtiveram alvo no gene *tax* com o software *miRanda*, apresentaram bons valores quando utilizado este outro algoritmo para análise, conforme se observa na Tabela 5. Outra divergência observada foi o resultado obtido para hsa-miR-125b, com o software *miRanda* este apresentou somente uma ligação com o RNAm do gene *tax*, enquanto o *RNAhybrid* demonstrou outra possível região de interação com este gene.

Tabela 5 – Análise dos miRNAs contra o gene *tax* do HTLV-1 pelo algoritmo *RNAhybrid*.

miRNA	Mfe(kCal/Mol)	Ligação miRNA e RNAm
hsa-miR-221	-29,9	5' C G A 3' AAGCC GCGGA UGUAGC UUUGG UCGUCU ACAUCG 3' C G GUU A 5'
	-25,3	5' G CCUGGG 3' UCUAGUGGAC GUAGCU GGGUCGUCUG CAUCGA 3' CUUU UUA 5'
hsa-miR-222	-27,8	5' G CCUGAUACA GGGC A 3' ACCC AGCC GGAUGUAGC UGGG UCGG UCUACAUCG 3' UCA A 5'
	-27,0	5' G A CU GG 3' UCUAGUGG CC G GUAGCU GGGUCAUC GG C CAUCGA 3' U U UA 5'
	-19,0	5' U GAGUU AA G G 3' UCUGG CCAGG UG GGC GGGUC GGUCU AC UCG 3' U AUC A A 5'
	-27,2	5' U GAA AG G 3' CAAG UAGGG CU AGGGG GUUC AUCCC GA UCCCU 3' AGU A A G 5'
hsa-miR-125b	-26,5	5' G U GCUC A G 3' UUAC GGU GGGGUUU UAGGGG AGUG UCA UCCCAGA GUCCCU 3' U A 5'

Observação: A primeira sequência de nucleotídeos é o RNAm alvo (5'→3') e a segunda é o miRNA maduro (3'→5').

Tabela 5 – Continuação.

miRNA	Mfe(kCal/Mol)	Ligação miRNA e RNAm
hsa-miR-149	-26,0	5' CACUAAAA UGG U 3' GGGGUG ACGG GGCCGG CCUCAC UGCC UCGGUC 3' C UUCUG U 5'
	-23,8	5' CA AA UC U 3' GGA GA AGG UGGGGCC GA CCU CU UCU GCCUCGG CU 3' C CA GU U 5'
	-28,3	5' AG U 3' GGAG GAAGGCA G GAGUUGGG CCUC CUUCUGU C CUCGGUCU 3' C A G 5'
	-25,0	5' A CCCUGAU A 3' GGGGU GAGAC AC AGCCGGG CCUCA UUCUG UG UCGGUCU 3' C C CC 5'
	-25,8	5' U A U U 3' GGGAG GAAGG GG CCGG CCCUC CUUCU CC GGUC 3' A GUG UC U 5'
hsa-miR-26a	-24,4	5' G AGG G C 3' GGCCUG CC GGGUU UUGGA UCGGAU GG CCUAA AACUU 3' A A UG 5'
hsa-miR-29a	-25,6	5' G GGA CGG A 3' GACCGG GGA GGUGC UUGGCU UCU CCACG 3' A AAAG A AU 5'
hsa-miR-374	-23,4	5' U GU GGG A 3' CUUAU GGUUGUA GUAA GAAUA CCAACAU UAUU 3' GU GU AA 5'
hsa-miR-142-5p	-16,3	5' C CGG G A 3' UGGUGCU G UUUUAU AUCACGA U AAAUA 3' UC AAGA G C 5'
hsa-miR-648	-23,8	5' U GAG G 3' CCAG GCCC GUAC C GGUC CGGG CGUG G 3' U A A U AA 5'

Observação: A primeira sequência de nucleotídeos é o RNAm alvo (5'→3') e a segunda é o miRNA maduro (3'→5').

Esses resultados demonstram divergências entre os algoritmos. Diante desta situação, todos os miRNAs identificados foram selecionados para validação inicial: hsa-miR-221, hsa-miR-222, hsa-miR-125b, hsa-miR-149, hsa-miR-26a, hsa-miR-29a, hsa-miR-374, hsa-miR-142-5p e hsa-miR-648.

A Figura 8 mostra de forma resumida as diferentes posições do gene *tax* do HTLV-1 onde os miRNAs analisados podem apresentar possíveis alvos de regulação.

Figura 8. miRNAs distribuídos em diferentes posições do gene *tax*. Cada cor representa um miRNA analisado e seu possível local de regulação.

Para determinar a presença de possíveis polimorfismos nas regiões do gene *tax* considerados alvos dos miRNAs, analisou-se a taxa de conservação das regiões-alvo com outros isolados do subtipo 1a_Cosmopolita provenientes de diferentes regiões geográficas. Essa análise, descrita no item 3.1.2, utilizou como sequência de referência ATK-1 (GenBank número de acesso J02029) e mais seis subtipos Transcontinental de HTLV-1a_Cosmopolita presentes em diferentes países, sob os números de acessos: AF139170 (Alemanha), AF259264 (China), NC 001436 (Caribe), D13784 (Caribe), AF033817 (Estados Unidos da América), U19949 (ATL-YS/Estados Unidos da América) e AY563953 (Brasil).

A Figura 9 exemplifica o alinhamento múltiplo das sequências-referência do HTLV-1, onde as porções destacadas representam as regiões do gene *tax* que o

miRNAs se ligam. O Apêndice I contém o alinhamento múltiplo parcial, destacando as regiões do gene que apresentam variações.

A taxa de conservação do gene *tax* é alta ($\approx 98\%$) entre os diferentes subtipos (KASHIMA et al., 2006). Nas regiões em que foram mapeados alvos de miRNAs, a similaridade nas sequências dos diferentes subtipos avaliados divergiram nas posições 7493 e 7796. A primeira posição corresponde à ligação com hsa-miR-125b e a segunda com reconhecimento do hsa-miR-149.

```

J02029ATK1  CAG AG C ATC AGA TCA CCT GGG ACC CCA TCG A TG GAC GCG TTA TCG GCT [192]
#BRRP425    ... ..
#BRRP438    ... ..
#D13784_1   ... ..
#AY563953   ... ..
#AF139170   ... ..
#NC001436   ... ..
#AF259264   ... ..

```

Figura 9. Alinhamento parcial da região do gene *tax* do HTLV-1 (48 bp). As bases destacadas referem-se às sequências-alvo encontradas pelo hsa-miRNA-221. A análise de todos os miRNAs contra o genoma do HTLV-1 encontra-se no Apêndice I.

4.2 Caracterização clínica dos pacientes

Neste trabalho, foram selecionados indivíduos sororeagentes para HTLV, PCR confirmatório para HTLV-1 e com avaliação médica que incluíram exames físicos e neurológicos. Estes pacientes são acompanhados atualmente no Ambulatório de Neurologia do HC/FMRP-USP. Os indivíduos infectados foram classificados de acordo com a manifestação de sintomas relacionados a esta infecção viral em: indivíduos assintomáticos (HAC) e pacientes com HAM/TSP (HAM).

Foram coletadas 21 amostras de sangue total para compor o grupo controle, 10 amostras de pacientes assintomáticos e 12 amostras de indivíduos com diagnóstico clínico de HAM/TSP. Imediatamente após a coleta das amostras, utilizou-se 1 mL de sangue total para avaliar os seguintes parâmetros laboratoriais: hemograma completo, contagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e posterior razão entre eles. Conforme pode ser observado na Tabela 6, os valores do leucograma variaram entre 3.700–12.500 células/mm³. Para população de linfócitos CD4⁺, os valores obtidos estiveram entre 468–2.497 células/mm³ e para linfócitos CD8⁺ 237–1.182 células/mm³. A razão obtida entre eles variou de 1,02 até 5,35.

Tabela 6 – Caracterização dos indivíduos soropositivos para HTLV-1 e controles de acordo com a contagem global de leucócitos, linfócitos CD4⁺ e CD8⁺.

Identificação	Contagem global de leucócitos	Contagem CD4 ⁺	Contagem CD8 ⁺	Razão CD4 ⁺ /CD8 ⁺
CT09	7200	902	606	1,49
CT10	8700	2087	423	4,94
CT11	9600	896	597	1,5
CT13	6000	673	387	1,74
CT14	8000	1178	273	4,32
CT15	8100	736	587	1,25
CT16	8000	1062	964	1,1
CT18	9200	1145	858	1,34
CT19	10100	1921	484	3,97
CT20	8200	1144	857	1,33
CT21	9500	1401	720	1,95
CT22	11300	1051	561	1,87
CT01	5500	643	314	2,05
CT23	6200	1702	612	2,78
CT24	8400	1101	430	2,56
CT25	10300	1704	659	2,59
CT26	7400	1440	269	5,35
CT27	7500	819	548	1,49
CT28	5500	718	716	1,00
CT29	7600	565	556	1,02
CT30	7900	575	323	1,78
HAC01	7400	1224	697	1,76
HAC12	11000	1267	1182	1,07
HAC13	8800	750	552	1,36
HAC15	5800	1142	1120	1,02
HAC16	7100	708	237	2,98
HAC19	4800	1166	274	4,26
HAC20	4100	720	369	1,95
HAC21	6200	1125	558	2,2
HAC22	6600	766	357	2,14
HAC23	11800	1329	456	2,92

Valores normais: Leucócitos totais de 4.000 a 11.000 células/mm³; CD4⁺: maior que 500 células/mm³; CD8⁺ de 400 a 1.200 células/mm³; razão maior que 1,2. ND: parâmetros não determinados.

Tabela 6 – Continuação.

Identificação	Contagem global de leucócitos	Contagem CD4 ⁺	Contagem CD8 ⁺	Razão CD4 ⁺ /CD8 ⁺
HAM01	7600	717	378	1,90
HAM02	8200	1025	239	4,29
HAM05	7100	2497	1001	2,49
HAM08	8200	ND	ND	ND
HAM09	3700	468	355	1,32
HAM10	9200	1084	237	4,57
HAM13	6800	728	556	1,31
HAM14	6200	665	256	2,60
HAM15	7600	919	402	2,29
HAM16	8600	1005	605	1,66
HAM17	12500	579	272	2,13
HAM18	ND	ND	ND	ND
HAM19	3900	ND	ND	ND

Valores normais: Leucócitos totais de 4000 a 11000 células/mm³; CD4⁺: maior que 500 células/mm³; CD8⁺ de 400 a 1200 células/mm³; razão maior que 1,2. ND: parâmetros não determinados.

Os resultados obtidos foram agrupados e analisados estatisticamente para observar se a quantidade de leucócitos totais ou se a razão entre as duas populações de linfócitos apresentava um perfil de distribuição diferenciado entre indivíduos controle e pacientes portadores do HTLV-1. Foi realizado teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Como pode ser observado na Figura 10, não houve diferença significativa entre os três grupos analisados.

Figura 10. Caracterização linfocitária dos indivíduos soropositivos para HTLV-1 **A.** Razão obtida entre linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. **B.** Caracterização dos indivíduos soropositivos para HTLV-1 de acordo com a contagem global de leucócitos. Utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn. Os valores de p obtidos não foram significativos.

Outra característica avaliada nestes pacientes foi a CPV, com objetivo de determinar a quantidade de provírus presentes nas células sanguíneas periféricas dos indivíduos infectados. A partir da curva-padrão definida pela diluição seriada do DNA da linhagem MT-2 (item 3.7.1), foi obtida a curva de regressão linear para os genes β -actina (controle endógeno) e gene *tax* viral (Figura 11).

Figura 11. Curva-padrão dos genes β -actina e *tax*. A curva foi construída a partir da diluição seriada (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 cópias de gene/ μ L) da linhagem celular MT-2.

O coeficiente de correlação (r^2) da curva-padrão variou entre 0,95 e 0,99 entre as corridas realizadas, enquanto o *slope* – que representa a inclinação da reta – foi

considerado entre -3,74 e -3,32 (correspondendo a eficiência de reação de 85 a 100%).

A partir da curva-padrão, a carga proviral dos pacientes foi calculada em número de cópias virais para cada 10^5 células por interpolação com o gráfico obtido. Posteriormente, os valores das amostras foram convertidos para base Log_{10} .

A Figura 12 mostra a quantificação da CPV para cada indivíduo infectado, demonstrando que a carga proviral está nove vezes mais elevada nos pacientes que apresentam a doença do que nos indivíduos assintomáticos. Utilizou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney ($p=0,0046$).

Figura 12. Distribuição da carga proviral ($\log_{10}$) entre os grupos de indivíduos assintomáticos (HAC) $n=6$ e com manifestações clínicas (HAM) $n=9$. A barra horizontal representa o valor da mediana para as amostras. Foi realizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney ($p=0,0046$).

4.3 Expressão da proteína Tax por “Western blot”

A expressão da proteína Tax nos pacientes portadores de HTLV-1 foi detectada por *Western blot*. Esta técnica foi considerada padronizada uma vez que a proteína Tax, a qual possui a massa molecular de 45 kDa, teve sua expressão detectada nas seguintes amostras: MT-2, utilizado como controle positivo com 2,4 genes por célula e HAM01, paciente com 15.257 cópias por 10^5 células. A amostra

CT09, utilizada com controle negativo, não expressou a proteína como era esperado. A proteína endógena tubulina, a qual possui 42 kDa, apresentou-se expressa em todas as amostras (Figura 13).

Deste modo, as demais amostras foram aplicadas e os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 13 a 15 seguidas pela Tabela 7, a qual se refere aos resultados expressos da IDV da proteína Tax, IDV da proteína tubulina e a razão do alvo pelo endógeno.

Figura 13. Expressão das proteínas Tax e tubulina. O controle negativo (CT09) não apresentou a expressão de Tax.

Figura 14. Expressão protéica de Tax e tubulina em amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1. Foram incluídos neste gel controle-positivo (MT-2) e controle-negativo (CT09).

Figura 15. Expressão protéica de Tax e tubulina em amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1.

Tabela 7 – Expressão de proteína Tax pela metodologia de *Western blot*.

Amostras	Tax	Tubulina	Razão entre as áreas
CT09	0	8.791.184	0,000
HAC01	10.039.104	12.489.376	0,804
HAC10	10.408.560	14.780.083	0,704
HAC13	19.220.489	9.575.841	2,007
HAC15	15.523.196	13.931.134	1,114
HAC16	5.022.024	12.548.669	0,400
HAC19	957.163	4.577.042	0,209
HAC20	13.163.125	6.779.497	1,942
HAC21	1.523.234	2.480.820	0,614
HAC22	4.429.062	8.544.548	0,518
HAC23	650.971	8.538.740	0,076
HAM01	56.779.241	56.706.413	1,001
HAM02	24.900.267	9.009.054	2,764
HAM05	10.210.355	12.546.770	0,814
HAM08	16.053.075	16.512.317	0,972
HAM09	7.027.284	10.968.648	0,641
HAM12	16.517.075	12.169.205	1,357
HAM13	6.205.598	5.367.870	1,156
HAM14	7.151.376	10.605.598	0,674
HAM16	3.994.175	28.334.823	0,141
HAM17	2.680.234	10.993.376	0,244
HAM18	7.689.891	13.224.598	0,581
HAM19	7.340.719	6.715.234	1,093
MT-2	23.243.681	6.965.477	3,337

HAC: Pacientes assintomáticos infectados pelo HTLV-1; HAM: Pacientes que apresentam HAM/TSP; CT09: indivíduo-controle; MT-2: Linhagem que contém HTLV-1 e expressa Tax constitutivamente.

4.4 Expressão da proteína Tax por citometria de fluxo

As células MT-2 e PBMC do CT09 foram descongeladas e tiveram sua viabilidade analisada através da permeabilidade da membrana ao iodeto de propídeo (Figura 16).

Figura 16. A. Gráfico em *dot plot* da viabilidade celular da amostra CT9. **B.** Viabilidade celular da linhagem MT-2.

Com a confirmação que as amostras continuavam viáveis após seu descongelamento, foi realizada a estabilização das células em meio de cultura e posterior quantificação da expressão da proteína Tax intracelular. Como controle positivo utilizou-se a linhagem MT-2 e como negativo utilizou-se o CT09 (Dados não mostrados).

A padronização da técnica foi realizada conforme descrito por Asquith et al. (2005). A marcação de membrana foi realizada com anticorpo anti-CD4 marcado com fluorocromo PC5 e a marcação intra-celular com Tax e anticorpo secundário marcado com Alexa Fluor 488. A quantidade de eventos adquiridos variou entre 2.000 a 10.000 eventos. Os valores obtidos para os pacientes assintomáticos (HAC) estão demonstrados em gráficos *dot plot* na Figura 17, enquanto os valores obtidos para HAM estão representados na Figura 18. Utilizou-se a quantidade de todas as PBMC que estão expressando a proteína Tax. Sabe-se que a técnica de citometria de fluxo consegue separar diferentes populações celulares, contudo Nagai et al. (2001) demonstraram que apesar do HTLV-1 infectar preferencialmente linfócitos T $CD4^+$, a Tax não é expressa somente neste tipo celular, uma vez que o retrovírus pode infectar outras células. Deste modo, para as quantificações padronizamos que seria realizada a *gate* na população total de PBMC. Os resultados obtidos foram expressos em quantidade de células infectadas para cada 100 analisadas (%).

Figura 17. Análise em *dot plot* dos pacientes assintomáticos (HAC) para expressão de CD4 e Tax. O quadro R7 representa a população duplo-negativa. O quadro R8 representa a população CD4 positiva e Tax negativa. O quadro R5 representa a população Tax positiva e CD4 negativa. O quadro R6 representa a população duplo-positiva. O quadro R9 representa a população duplo-positiva com gate em linfócitos T CD4⁺.

Figura 18. Análise em *dot plot* dos pacientes HAM/TSP para expressão de CD4 e Tax. O quadro R7 representa a população duplo-negativa. O quadro R8 representa a população CD4 positiva e Tax negativa. O quadro R5 representa a população Tax positiva e CD4 negativa. O quadro R6 representa a população duplo-positiva. O quadro R9 representa a população duplo-positiva com *gate* em linfócitos T CD4⁺.

A soma dos quadros R5 e R6 correspondem à porcentagem de proteína expressa, enquanto o quadro R9 representa a quantidade de linfócitos T CD4⁺ que estão produzindo esta proteína intracelularmente. A Tabela 8 mostra os valores da proteína Tax obtidas tanto em linfócitos CD4⁺, que corresponde ao quadro R9, quanto expresso na população total de PBMC, que representa a soma dos quadros R5 e R6.

Tabela 8 – Expressão da proteína Tax pela metodologia de citometria de fluxo.

Amostra	Tax (total)	Tax (TCD4⁺)
HAC 16	0,87	0,14
HAC 19	0,48	0,16
HAC 21	4,12	3,32
HAC 23	0,53	0,05
HAM 01	1,20	0,44
HAM 05	3,39	1,72
HAM 09	4,56	3,66
HAM 14	4,21	2,97
HAM 15	4,07	2,67
HAM 16	1,15	0,87
HAM 17	1,09	0,54
HAM 18	2,75	2,33

HAC: Pacientes assintomáticos infectados pelo HTLV-1; HAM: Pacientes que apresentam HAM/TSP.

4.5 Correlações entre a expressão da proteína Tax e CPV

Foi realizado o teste não-paramétrico de Spearman para correlacionar os valores da CPV com a expressão da proteína Tax. Na Tabela 9, estão tabelados os valores protéicos obtidos pela metodologia de *Western blot* e pela metodologia de citometria de fluxo, bem como os valores obtidos para CPV. Nota-se que os valores estão distribuídos para cada paciente e que a carga proviral não teve seus valores absolutos transformados para Log₁₀.

Tabela 9 – Valores obtidos com relação à expressão da proteína Tax pela metodologia de *Western blot*, seguido pela expressão de Tax pela metodologia de Citometria de Fluxo e a carga proviral para cada paciente analisado.

Amostras	Western	Citometria	CPV
HAC01	0,80	ND	50,96
HAC12	1,36	ND	491,94
HAC13	2,01	ND	ND
HAC15	1,11	ND	ND
HAC16	0,40	0,87	ND
HAC19	0,21	0,48	233,88
HAC20	1,94	ND	224,96
HAC21	0,61	4,12	ND
HAC22	0,52	ND	0,00
HAC23	0,08	0,53	0,00
HAM01	1,00	1,20	368,18
HAM02	2,76	ND	1233,97
HAM05	0,81	3,39	3296,98
HAM08	0,97	ND	1090,20
HAM09	0,64	4,56	775,40
HAM13	1,16	ND	303,78
HAM14	0,67	4,21	ND
HAM15	ND	ND	1323,84
HAM16	0,14	1,15	0,00
HAM17	0,24	1,09	42,07
HAM18	0,58	2,75	ND
HAM19	1,09	ND	2068,97

HAC: Pacientes assintomáticos infectados pelo HTLV-1; HAM: Pacientes que apresentam HAM/TSP. ND: Valores não-determinados

Foram calculadas as correlações entre CPV vs Tax (*Western blot*), CPV vs Tax (citometria) e Tax (*Western blot*) vs Tax (citometria). Na primeira análise o valor de r foi de 0,7182 e o valor de p significativo (0,0128). Quando comparado CPV vs Tax (citometria), obteve-se uma correlação positiva ($r = 0,6847$), porém a análise não foi significativa ($p = 0,1095$). Por fim, foram analisadas as duas metodologias utilizadas para quantificar a proteína. Elas também apresentaram

correlação positiva ($r = 0,6129$) e valor de p significativo ($p=0,0151$). O gráfico de correlação das amostras pode ser observado na Figura 19.

Figura 19. Análise da correlação, pelo teste não-paramétrico de Spearmann. **A.** Correlação positiva entre CPV e *Western blot* ($r = 0,7182$) e resultado significativo ($p= 0,0128$). **B.** Figura demonstrando correlação entre CPV vs Expressão de Tax por citometria ($r = 0,6847$). Nessa análise o valor de p foi 0,1095. **C.** Correlação positiva ($r = 0,6129$) entre as duas metodologias utilizadas para quantificar a proteína de interesse. O valor de p obtido foi significativo ($p=0,0151$).

4.6 Análise da expressão dos miRNAs maduros pela metodologia do PCR em Tempo Real

De um número inicial de quase 100 miRNAs candidatos, o número se restringiu para nove que foram validados por qRT-PCR a partir de todas as amostras obtidas neste estudo. A análise dos dados foi realizada separadamente para CT vs pacientes, utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney ou CT vs HAC vs HAM, utilizando o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn.

Todos os miRNAs que estavam diferencialmente expressos no painel; que apresentaram relatos de regulação pós-transcricionais de genes desregulados na infecção pelo HTLV-1 e que apresentaram alvo no gene *tax* do HTLV-1 foram quantificados por análise relativa de expressão.

4.6.1 Quantificação de RNU utilizados como controle endógeno

A quantificação dos miRNAs maduros foi relatada por análise comparativa de expressão (método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$). Neste caso, é necessária a utilização de um controle endógeno. Foram selecionados três RNA nucleolares, cuja quantificação foi realizada em todos os indivíduos para determinar seus níveis de expressão: RNU24,

RNU43 e RNU48 (Applied Biosystems, FosterCity, CA, EUA). Foi confeccionado um gráfico em *dot plot*, cujas barras horizontais representam a mediana entre os indivíduos. Observa-se que o RNU48 apresenta valor mais baixo de expressão quando comparado aos outros RNU, porém ao aplicarmos teste estatístico de Kruskal-wallis verificou-se que esta diferença não é significativa (Figura 20).

Figura 20. Expressão dos RNU utilizados como controle endógeno para análise da expressão relativa dos miRNAs. As barras horizontais representam a mediana das amostras. Foi realizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, a diferença observada não foi significativa ($p > 0,05$).

Foram confeccionados gráficos (Figura 21) para verificar se os valores obtidos entre os diferentes Ct para cada amostra estavam correlacionados. Os valores obtidos foram comparados: RNU48 vs RNU43, RNU 48 vs RNU 24 e RNU43 vs RNU24. A análise demonstra uma forte correlação positiva entre todos os RNU e um p valor significativo ($< 0,0001$). Utilizou-se o teste de correlação de Spearman para análise destes dados.

Figura 21. Gráfico da correlação entre os diferentes RNU. **A.** Correlação entre RNU48 vs RNU43. **B.** RNU 48 vs RNU 24. **C.** RNU43 vs RNU24. Observa-se que todos apresentaram uma correlação positiva com valor de $p < 0,0001$.

Essa correlação indica que a diferença de valores entre as amostras referia-se à qualidade do RNA extraído e não a uma variação entre os tipos celulares, portanto utilizou-se a média geométrica dos Cts obtidos para cada indivíduo a fim de normalizar as reações de qRT-PCR (VANDESOMPELE et al., 2002).

4.6.2 Análise dos hsa-miR-149 e hsa-miR-648

A quantificação destes foi realizada, contudo, eles não se apresentam expressos nos tipos celulares estudados. Logo, as análises e os dados da quantificação relativa destes dois miRNAs não estão relatados.

4.6.3 Análise do hsa-miR-221

A quantificação relativa deste miRNA está representada nas Figura 22A e B, que são referentes às análises comparativas realizadas com controles (CT) vs pacientes; e CT vs pacientes assintomáticos (HAC) vs portadores de mielopatia (HAM). Os gráficos mostram que a expressão do hsa-miR-221 entre os grupos é semelhante não havendo significado estatístico para o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. ($p > 0,05$). Com relação a análise realizada por Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, usado para correlacionar os grupos, também não apresentou significado estatístico.

Figura 22. Expressão relativa do hsa-miR-221 **A.** Análise entre controle (CT) e Pacientes não revelou significado estatístico entre os grupos ($p=0,3078$). Foi utilizado teste não-paramétrico de Mann-Whitney. **B.** Expressão do hsa-miR-221 entre os grupos controle (CT), portadores assintomáticos (HAC) e com HAM/TSP (HAM). A análise estatística utilizada foi Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn e o p valor obtido não foi significativo em nenhum dos grupos analisados ($p= 0,5056$). Em ambos, as barras horizontais representam as medianas dos valores de cada grupo.

4.6.4 Análise do hsa-miR-222

A Figura 23A refere-se às análises comparativas realizadas para o hsa-miR-222 entre controles vs pacientes, pelo teste estatístico de Mann-Whitney. Na Figura 23B observa-se as análises realizadas com controles (CT) vs indivíduos portadores assintomáticos (HAC) vs pacientes com HAM/TSP (HAM), pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. Na primeira análise

observa-se uma expressão similar entre pacientes e controles, porém quando os grupos são separados nota-se uma diminuição não significativa da expressão deste miRNA no grupo HAC em relação ao HAM.

Figura 23. Expressão do hsa-miR-222 **A.** Observa-se diminuição no grupo controle (CT) com relação aos pacientes. A análise estatística utilizando o teste estatístico de Mann-Whitney, não foi significativa entre os grupos ($p=0,3713$). **B.** Expressão do hsa-miR-222 entre os grupos controle (CT), portadores assintomáticos (HAC) e com HAM/TSP (HAM). A análise estatística (Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn) não foi significativa em nenhum dos grupos analisados ($p=0,1945$). As barras horizontais representam as medianas dos valores de cada grupo

4.6.5 Análise do hsa-miR-142-5p

A expressão deste miRNA apresenta-se diminuída nos pacientes quando comparada a CT (Figura 24), porém o decréscimo observado não apresenta significado estatístico ($p>0,05$). Com relação à análise realizada entre Ct vs HAC vs HAM, também não se observou diferença estatística ($p=0,6716$).

Figura 24. Expressão do hsa-miR-142-5p. **A.** Apesar de ser observada uma diminuição dos pacientes frente aos indivíduos-controle o teste não-paramétrico de Mann-Whitney não foi significativo ($p=0,4349$). **B.** Expressão entre os grupos controle (CT), portadores assintomáticos (HAC) e com HAM/TSP (HAM). A análise estatística utilizada foi Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn, o resultado não foi significativo em nenhum dos grupos analisados ($p= 0,6716$). Em ambos, as barras horizontais representam as medianas dos valores de cada grupo.

4.6.6 Análise do hsa-miR-26a

O hsa-miR-26a apresenta expressão semelhante entre os grupos analisados (Figura 25). Em nenhum dos testes estatísticos realizados, os resultados das análises foram significativas ($p>0,05$).

Figura 25 A. A expressão do hsa-miR-26a encontra-se semelhante entre os grupos. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney não foi significativo ($p=0,7244$). **B.** A análise estatística de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn não foi significativa em nenhum dos grupos analisados ($p= 0,7910$). Em ambos, as barras horizontais representam as medianas dos valores de cada grupo.

4.6.7 Análise do miR-29a

A expressão deste miRNA apresenta-se diminuída nos pacientes (Figura 26A), contudo não houve significado estatístico ($p>0,05$). Esse decréscimo não foi observado no grupo CT vs HAC, uma vez que o último apresenta expressão levemente aumentada. O mesmo grupo também está aumentado quando comparado com o grupo HAM (Figura 26B). Este, porém, encontra-se diminuído frente à mediana dos indivíduos-controle. A análise realizada entre Ct vs HAC vs HAM não foi significativa ($p=0,5791$).

Figura 26 A. Expressão do hsa-miR-29a encontra-se aumentada no grupo controle (CT) comparada aos pacientes. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney não foi significativo entre os grupos ($p=0,5624$). **B.** Expressão entre os grupos controle (CT), portadores assintomáticos (HAC) e com HAM/TSP (HAM). A análise estatística utilizada foi Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn, não apresentou resultado significativo em nenhum dos grupos analisados ($p=0,5791$). Em ambos, as barras horizontais representam as medianas dos valores de cada grupo.

4.6.8 Análise do hsa-miR-374

Este miRNA apresenta sua expressão diminuída nos pacientes (Figura 27A), contudo não houve significado estatístico ($p=0,5126$). Quando os pacientes foram analisados separadamente, nota-se que o hsa-miR-374 está igualmente expresso entre o grupo controle vs HAC (Figura 27B). Com relação ao grupo HAM os níveis deste miRNA encontra-se diminuído, contudo não apresentou resultados significativos ($p=0,4029$).

Figura 27 A. O hsa-miR-374 encontra-se diminuído nos pacientes. O teste não-paramétrico de Mann-Whitney não foi significativo entre os grupos ($p=0,5126$). **B.** Expressão entre os grupos controle (CT), portadores assintomáticos (HAC) e com HAM/TSP (HAM). Apesar da diminuição encontrada no grupo HAM a análise estatística utilizada (Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn) não apresentou resultado significativo em nenhum dos grupos analisados ($p= 0,4029$). Em ambos, as barras horizontais representam as medianas dos valores de cada grupo

4.6.9 Análise do hsa-miR-125b

O hsa-miR-125b foi um dos miRNAs utilizados na validação biológica e os resultados estão apresentados na Figura 28. Este miRNA apresenta sua expressão elevada no grupo de pacientes. Esse aumento é estatisticamente significativo ($p=0,0285$). Quando os grupos são analisados separadamente observa-se um aumento progressivo entre os indivíduos-controle, HAC e HAM. Essa elevação é estatisticamente significativa ($p=0,0312$).

Figura 28 A. Expressão do hsa-miR-125b no grupo controle (CT) e de pacientes. Foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, o valor de p obtido foi significativo entre os grupos ($p=0,0285$). **B.** Expressão do hsa-miR-125b entre os grupos controle (CT), portadores assintomáticos (HAC) e com HAM/TSP (HAM). O teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn foi significativo ($p=0,0312$). As barras horizontais representam as medianas dos valores de cada grupo

4.7 Análise da correlação entre a carga proviral e os miRNAs

O teste de Spearman, foi realizado para analisar correlação entre os miRNAs, a carga proviral dos indivíduos e expressão da proteína Tax. A tabela 10 mostra os valores obtidos dos coeficientes de correlação para cada miRNA analisado.

O valor de r positivo para alguns miRNAs indica que a expressão destes é diretamente proporcional aos demais parâmetros. Por sua vez, os miRNAs que apresentam valores de r negativo, significa que a correlação é inversa. Em todos os casos analisados, o valor de p mostra que não existe correlação para nenhum miRNA analisado.

Tabela 10 – Valores dos coeficientes de correlação de Spearman – miRNA vs CPV, miRNA vs Tax (*Western*), miRNA vs Tax (citometria)

miRNA	CPV		Tax (<i>Western</i>)		Tax (citometria)	
	r_s	p-valor	r_s	p-valor	r_s	p-valor
hsa-miR-221	0,04663	0,8590	0,09221	0,6910	-0,006	0,4914
hsa-miR-222	0,003638	0,9888	0,1104	0,6337	0,4196	0,0873
hsa-miR-125b	0,1939	0,2280	0,2104	0,3600	0,5455	0,0666
hsa-miR-142-5p	0,05034	0,8479	0,2072	0,3675	0,0559	0,4314
hsa-miR-26a	0,1525	0,5590	-0,1378	0,5513	-0,0909	0,3894
hsa-miR-29a	-0,1603	0,5388	-0,2255	0,3258	-0,0700	0,4144
hsa-miR-374	-0,1410	0,5893	-0,1544	0,4926	-0,1818	0,2859

Como nenhum miRNA revelou significado estatístico frente a expressão de CPV ou da proteína Tax, os gráficos que representam essas análises não estão mostrados.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A infecção pelo HTLV-1 faz com que aproximadamente 5% dos indivíduos infectados desenvolvam patologias associadas. A proteína Tax está altamente envolvida nos mecanismos que levam a este fenômeno, contudo existem evidências que fatores do hospedeiro estão relacionados ao surgimento das manifestações clínicas (ASQUITH & BANGHAM, 2008). Pichler et al. (2008) e Yeung et al. (2008) iniciaram estudos pela técnica de *microarray* que evidenciam a participação de miRNAs humanos no controle da atividade da proteína Tax e como consequência no surgimento da ATLL. Este projeto por sua vez, utilizou ferramentas de Bioinformática para tentar elucidar miRNAs humanos que possuísem alvo no gene *tax* e pudessem ser correlacionados com o desenvolvimento de HAM/TSP.

Diversos algoritmos são utilizados no *screening* inicial para predição de alvos entre miRNAs e RNAm. Todos A dificuldade inicial encontrada neste trabalho foi a obtenção de mais de 100 possíveis miRNAs que poderiam ser alvo do gene *tax*, quando utilizado o algoritmo *miRanda*. Bentwich (2005), já havia relatado que a desvantagem de uma análise computacional é que os algoritmos disponíveis para predição de alvos de miRNAs resultam em um grande número de alvos preditos dificultando assim, a escolha dos melhores candidatos para avaliação experimental no sistema biológico estudado. A revisão da literatura possibilitou a restrição dos resultados iniciais, pois muitos miRNAs obtidos pela análise *in silico* não estavam descritos como participantes de processos celulares relevantes para nosso estudo. Além disso, nosso grupo de pesquisa confeccionou um painel com mais de 100 miRNAs, para realização de um *screening* com linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ isolados de pacientes infectados pelo HTLV-1.

Com o número de miRNAs mais restrito comparado com as análises iniciais, os resultados que já haviam sido gerados pelo *miRanda* foram revistos e analisados novamente por outro programa computacional, o *RNAhybrid*. A escolha deste programa foi devido à diferença entre as análises que os softwares priorizam. Estes podem se basear na complementaridade da região da semente, conservação das sequências miRNA/RNAm ou termodinâmica da ligação (Mfe). Como existem diferentes parâmetros que podem ser analisados, é comum que cada algoritmo considere os resultados obtidos por determinado tipo de parâmetro em detrimento de outro, e desta forma, apresentem resultados que possam ser divergentes (ZHANG et

al., 2006; GRAD et al., 2003; LAI, 2004). Observando as diferenças que foram obtidas entre o *miRanda* e o *RNAhybrid*, explica-se porque os valores de Mfe nas análises foram levemente discrepantes. Enquanto o primeiro apresentou valores que variaram entre -30,47 e -20,36 kCal/Mol, os valores de Mfe para os mesmos miRNA no segundo *software* foram mais altos (entre -29,9 e -19,0 kCal/Mol). Este fato ocorre porque o *RNAhybrid* analisa cada ligação entre os nucleotídeos através da estatística de Poisson que gera um valor de p que deve ser significativo para ser gerado o resultado. Ou seja, há utilização de modelos estatísticos para determinar se os *duplexes* formados entre miRNA e seu alvo são termodinamicamente estáveis em sistemas biológicos (REHMSMEIER, 2004).

Essa mesma explicação justifica outros resultados obtidos com relação ao hsa-miR-26a, hsa-miR-29a, hsa-miR-374, hsa-miR-142-5p e hsa-miR-648. Estes miRNAs não apresentaram nenhum alvo quando analisados pelo *miRanda*, porque o mesmo prioriza a ligação da região da semente. Brenneck et al. (2005), demonstraram que uma inibição eficiente da tradução ocorre quando os oito nucleotídeos encontram-se complementares ao RNAm. Quando ocorre uma falta de pareamento na posição 2 e/ou 7, a eficiência do miRNA para reprimir a tradução cai em 50%. Como o *score* é baseado nestes fatores e o valor pré-definido foi aumentado para 120, esses miRNAs foram considerados como se não possuíssem alvo. Como no *RNAhybrid* a análise primordial é baseada na energia livre (Mfe) e esta foi considerada aceitável para o *software*, ele considerou estes quatro miRNAs capazes de inibir o gene *tax*. Os resultados divergentes não são considerados como incompatíveis, na verdade são complementares e torna os resultados mais confiáveis (SETHUPATHY et al., 2006). Os autores demonstraram que quando utilizado apenas um algoritmo para a predição de alvos, a porcentagem dos miRNAs que são validados é de aproximadamente 48%. Porém, quando se utiliza outro algoritmo para a realização das análises e os resultados obtidos são comparáveis, o índice de predição sobe para 72,6%, tornando este dado mais confiável para validação biológica. Entretanto, essas análises computacionais geram falso-positivos, pois os programas não conseguem prever qual o miRNA transcrito nem sua quantidade em um determinado tipo celular, visto que este miRNA e seus alvos devem estar localizados na mesma célula para que ocorra inibição da tradução (MAZIÈRE & ENRIGHT, 2007).

Dos nove miRNAs escolhidos para validação, o hsa-miR-149 e o hsa-miR-648 foram selecionados com base nas análises de Bioinformática e no levantamento bibliográfico, sem avaliação prévia dos resultados obtidos no painel realizado pelo nosso grupo. O hsa-miR-149, um dos primeiros miRNAs escolhidos para validação, apresentou o problema descrito acima. Este miRNA, nas análises por Bioinformática, gerou resultados excelentes e compatíveis entre os algoritmos *miRanda* e *RNAhybrid*, além de possuir cinco regiões de ligação no gene *tax* do HTLV-1 (Tabelas 4 e 5). Além dos resultados de Bioinformática descritos pelo nosso grupo, Hariharan et al. (2005) utilizaram outras ferramentas de análise *in silico* que descreveram este miRNA como potencial regulador do gene *vpr* do HIV-1. Este gene produz uma proteína regulatória, cuja principal característica é controlar a divisão e a apoptose das células infectadas. Diante destas boas evidências computacionais escolhemos o hsa-miR-149 para iniciarmos a análise biológica, contudo verificamos que ele não é expresso em leucócitos no início da sua validação. Outro miRNA que não apresentou expressão é o hsa-miR-648. Hakim et al. (2008) analisaram *in silico* miRNAs homólogos a diversos lentivírus, retrovírus e retrotransposons. Os resultados demonstraram que este miRNA, poderia se ligar com boa complementaridade na região *tax* do HTLV-1, sugerindo uma possível regulação deste gene. Enquanto neste trabalho a ligação do hsa-miR-648 no RNAm seria na região 7014 do genoma do HTLV-1, nossos resultados demonstraram a existência de um sítio de regulação localizado na posição 7218. Entretanto, mesmo com bons resultados *in silico*, estes não foram validados porque o miRNA não está expresso em células mononucleares de sangue periférico. Essas dificuldades iniciais encontradas neste projeto corroboram aquelas descritas por Mazière & Enright (2007), pois nossos dados sugerem que a Bioinformática não consegue prever qual é o gene que está sendo transcrito num determinado tipo celular e por consequência qual miRNA está sendo efetivamente expresso.

Com relação à escolha de qual região do genoma viral que seria inicialmente estudada, elegeu-se a região regulatória *tax* devido a sua importância na infecção pelo HTLV-1 e possível participação no desenvolvimento da mielopatia. Em indivíduos HAM/TSP existe uma maior quantidade de células T CD4⁺, que expressam RNAm de *tax* e, conseqüentemente, uma maior quantidade desta proteína está sendo traduzida. Essa alta expressão de Tax faz com que haja imortalização e expansão de células infectadas com o vírus. Esses eventos podem

ocorrer pela ligação da proteína Tax diretamente em *enhancers* que controlam a transcrição de determinados genes ou pela ligação da mesma no fator de transcrição I κ B, permitindo liberação e ativação do NF- κ B (revisado por BOXUS et al., 2008). Desta forma, devido ao papel que a proteína Tax exerce para o início do desenvolvimento da mielopatia, escolhemos identificar miRNAs do hospedeiro que pudessem estar envolvidos na regulação de sua tradução. Consideramos que seria importante no entendimento da biologia viral, bem como para entender aspectos relacionados ao desenvolvimento das manifestações clínicas. Sabe-se que por ter importância na regulação de células infectadas pelo HTLV-1, a taxa de conservação da proteína Tax é extremamente alta, aproximadamente 98% (KASHIMA et al., 2006).

Portanto, após a análise utilizando os algoritmos, avaliamos se as potenciais regiões-alvo do gene *tax* não apresentavam polimorfismos. Essa análise é importante, pois trocas de bases na região da semente sugerem que o miRNA pode não inibir o RNAm alvo com a mesma eficiência (BRENNECK et al. 2005). Diante disso, nosso objetivo foi avaliar se os miRNAs analisados neste projeto poderiam apresentar maior ou menor regulação dependendo do subtipo de HTLV-1 em estudo. Com relação a esta análise, diferentes isolados de subtipos de HTLV-1a_Cosmopolita foram alinhados a partir dos nu 7400 até 8000. Apesar do gene iniciar a transcrição de Tax a partir os polimorfismos estão localizados nesta região. Nossos resultados (Apêndice I) demonstram que há alteração de dois nucleotídeos. O primeiro, que é uma troca de A→T, localizado na posição 7493, foi considerado como potencial alvo do hsa-miR-125b. O segundo polimorfismo é troca de G→C na posição 7796, que é uma das possíveis ligações do hsa-miR-149. Em ambos, as trocas de base localizam-se na porção 5' do RNAm, portanto não compõe a região da semente, que é formada pela 3'UTR. Não foi observado mais nenhum polimorfismo em outra região-alvo dos miRNAs escolhidos para validação. Uma vez que o gene *tax* utilizado para análise pelos algoritmos *miRanda* e *RNAhybrid*, é de um isolado brasileiro (item 4.1) e não há trocas de nucleotídeos nas regiões da semente, acreditamos que os dados gerados *in silico* podem ser extrapolados quando avaliados outros subtipos de HTLV-1 (BRENNECK et al. 2005).

Posteriormente às análises de Bioinformática, foi iniciada a validação experimental dos miRNAs selecionados, através da quantificação pelo qRT-PCR. Amostras de sangue total de indivíduos-controle e de pacientes foram coletadas. Por

se tratar de uma doença que somente 2 a 5% dos indivíduos infectados desenvolvem manifestações clínicas (revisado por ARAÚJO & SILVA, 2006), o número de pacientes incluídos neste estudo foram 12 com HAM/TSP e 10 assintomáticos. Todos os indivíduos foram inicialmente caracterizados quanto à contagem global de leucócitos, linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺. Com relação à análise imunofenotípica, seu significado clínico está relacionado com o estado imunológico do hospedeiro. Em organismos saudáveis, a razão de linfócitos TCD4⁺/TCD8⁺ deve ser no mínimo 1,2. Quando ocorre diminuição deste valor, infere-se que a imunidade adaptativa esteja comprometida por destruição ou diminuição da produção das células T auxiliaadoras. Nossas quantificações de leucócitos totais e linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ mostram que os valores observados das medianas, tanto nos controles como nos pacientes, não diferiram e encontram-se dentro da normalidade, sendo possível inferir que não há comprometimento do sistema imunológico nos indivíduos coletados. Essa caracterização condiz com relatos da literatura, os quais mostram que mesmo infectando células T CD4⁺, a resposta imune desencadeada pelo HTLV-1 difere do HIV-1. Na infecção pelo HTLV-1, a diminuição deste tipo de linfócitos não é tão evidente como na infecção pelo HIV-1. Essa persistência da infecção viral ocorre porque a grande maioria dos linfócitos que se encontram infectados apresentam baixa concentração de proteínas virais, não sendo reconhecidos pelas CTLs. Além disso, não existe a liberação de vírus que possam causar lise celular, uma vez que a transmissão necessita do contato célula-célula. Por fim, clones de linfócitos contendo provirus podem persistir por meses, uma vez que a baixa expressão da proteína Tax é suficiente para imortalização sem que ocorra aumento da expressão de MHC de classe I. Assim, é possível observar que o HTLV-1 possui mecanismos que fazem com que a infecção seja persistente e, conseqüentemente, só ocorra alterações dos números de linfócitos, quando a patologia desenvolvida pelo hospedeiro é a ATLL (revisado por ASQUITH & BANGHAM, 2008).

Outro aspecto analisado nos pacientes foi a quantificação da CPV e da proteína Tax. Com relação à carga proviral, que determina a quantidade de provirus presentes nas células, esta é uma importante ferramenta biológica para o monitoramento da infecção pelo HTLV-1, pois associar a elevação da CPV está associada com o desenvolvimento das patologias (NAGAI et al., 1998). Vários métodos foram descritos até o momento para quantificar a carga proviral dos

indivíduos com HTLV-1. Um deles é o método de PCR semi-quantitativo que é baseado na diluição seriada das amostras e posterior análise da intensidade das bandas amplificadas (ISHIHARA et al., 1994; KUBOTA et al., 1993). Outro é o PCR quantitativo-competitivo (QC-PCR) baseado na amplificação no DNA de interesse a ser quantificado e o competidor, que é DNA em quantidade conhecida de célula infectada adicionado antes da amplificação e que é co-amplificado no mesmo tubo de reação (ALBRECHT et al., 1998; LEHKY et al., 1998). Atualmente, a metodologia mais empregada é a PCR em tempo real que foi o método selecionado para este projeto (ASQUITH et al., 2005; CÉSAIRE et al., 2001; LEE et al., 2004; MONTANHEIRO et al., 2005). A carga proviral deste estudo apresentou diferença significativa ($p = 0,0046$) de 10 vezes entre os grupos HAC e HAM/TSP. Estes resultados auxiliaram na caracterização clínica dos pacientes utilizados neste estudo e estão de acordo com o descrito na literatura, que relata que pacientes com mielopatia apresentam aumento de pelo menos cinco vezes na quantidade de provirus inserido no DNA de PBMC (NAGAI et al., 1998; YAMANO et al., 2002).

A quantificação da proteína Tax foi realizada para observar se os indivíduos que possuíam alta carga proviral também apresentavam uma quantidade maior de proteína sendo traduzida. Yamano et al. (2002) e Asquih et al. (2005) demonstraram que há uma correlação positiva entre CPV e expressão proteica de Tax. Para a obtenção dos nossos resultados, utilizamos duas metodologias distintas para realizar esta quantificação. A primeira foi a técnica de *Western blot*, conforme descrito por Lee et al. (1989) foi realizado no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob a supervisão da Prof^aDr^a Fabíola Attié de Castro. Após a padronização da técnica, nossos resultados demonstraram ser condizentes com os encontrados na literatura, pois sugerem que a quantidade de proteína regulatória viral sendo expressa é diretamente proporcional aquela de provirus inserida (YAMANO et al., 2002 e ASQUITH et al., 2005).

A outra metodologia utilizada foi a técnica de citometria de fluxo. Esta técnica foi importante para realização deste trabalho, pois diversos autores utilizaram-na para correlacionar a CPV com a expressão proteica e mostrar que a quantidade de provirus é diretamente proporcional à expressão de Tax (ASQUITH et al., 2005; PICHLER et al., 2008; YAMANO et al., 2002). A literatura utiliza um anticorpo monoclonal denominado Lt-4, o qual é produzido através da técnica do hibridoma e possui alta afinidade com a proteína Tax (LEE et al., 1989). Neste projeto utilizamos

este anticorpo, gentilmente cedido pelo Dr Yuetsu Tanaka da University of the Ryukyus, Okinawa, Japão. A quantificação da proteína Tax foi realizada seguindo os protocolos dos trabalhos publicados, sob supervisão do Prof. Dr. Charles Bangham, no *Imperial College* em Londres. Os valores obtidos para cada indivíduo, descritos na tabela 8, foram comparados com a CPV. A análise não-paramétrica de Spearmann demonstrou que não há correlação entre os valores. Acreditamos que o número de amostras que foram pareadas é baixo (sete amostras), conforme pode ser observado na Tabela 9. Quando o pareamento foi realizado entre a expressão de Tax por citometria vs *Western blot* (as quais apresentam 11 amostras pareadas), os resultados mostraram-se significativos ($p=0,0151$) e a expressão está positivamente correlacionada ($r=0,6129$). Apesar de algumas amostras não estarem determinadas é possível inferir que nossos dados estão de acordo com a literatura (ASQUITH et al., 2005; PICHLER et al., 2008; YAMANO et al., 2002) e que podemos utilizar os valores obtidos pela técnica de *Western blot* para observar expressão da proteína Tax em pacientes que não tiveram a mesma quantificada por citometria de fluxo.

Dessa forma, após a coleta de indivíduos-controle e pacientes, foi iniciada a quantificação dos miRNAs selecionados pela metodologia de qRT-PCR. A escolha dessa tecnologia baseou-se na sensibilidade do método em distinguir a expressão de miRNAs semelhantes entre si. Isto se faz necessário, pois o hsa-miR-221 e hsa-miR-222 são da mesma família, localizam-se na mesma região intergênica do cromossomo X em *loci* muito próximos (distantes 727 pares de base) e apresentam grandes semelhanças entre seus miRNAs maduros. Conforme descrito por Chen et al. (2005), a transcrição por *stem-loop* RT-PCR faz com que o erro de quantificação entre miRNAs da mesma família e com muito similares, seja menor que 2,5 %.

Quanto aos controles endógenos, utilizamos RNA nucleolares não-codificantes (snoRNA), para serem utilizados como normalizador da reação de qRT-PCR. O emprego de RNUs para quantificação relativa de expressão dos miRNAs é porque eles possuem expressão celular comparável aos níveis de β -actina e GAPDH (WONG et al. 2005). Com relação a estes genes *housekeeping* sabe-se que muitos possuem sua expressão alterada dependendo do nível de ativação que uma célula se encontra (VANDESOMPELE et al., 2002). Estes mesmos autores ranqueiam a estabilidade da expressão desses genes endógenos em diferentes tecidos (neuroblastoma, fibroblasto, leucócitos e medula óssea) e finalizam o trabalho

sugerindo a utilização de diferentes genes *housekeeping* e posterior cálculo da média geométrica entre os valores obtidos para que o uso de normalizadores seja utilizado de maneira mais exata. Como não existem trabalhos que determinem qual RNU deve ser empregado como normalizador nos tipos celulares que estudamos (PBMC), utilizamos três RNU diferentes (RNU24, RNU43 e RNU49). Como demonstramos em nossos resultados estes foram considerados bons normalizadores, pois a mediana entre os grupos foi semelhante e houve uma forte correlação entre eles, evidenciando que o Ct das amostras variou de acordo com a qualidade do RNA extraído. Dessa forma, a média geométrica dos três foi utilizada como normalizador para o cálculo da fórmula do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (VANDESOMPELE et al., 2002).

Com relação aos miRNAs, conforme mencionado anteriormente, estes foram escolhidos nos momentos iniciais deste projeto com base nos resultados das análises *in silico* e revisão bibliográfica. Os primeiros testes foram realizados com hsa-miR-149 e hsa-miR-648, os quais não apresentaram expressão nas populações de interesse, conforme discutido anteriormente. Assim, diante desta primeira tentativa de validação e com o painel de expressão dos miRNAs de células T CD4⁺ e T CD8⁺ confeccionados, outro parâmetro foi adicionado para validação. Desta forma, os hsa-miR-221, 222, 125b, 142-5p, 29a, 26a e 374 também foram validados.

O hsa-miR-221 e hsa-miR-222 são dois miRNAs que estão altamente expressos em carcinomas de próstata (GALARDI et al., 2007) e de pâncreas (LEE et al., 2007). A agressividade do tumor e a alta expressão destes miRNAs se deve ao fato de que as proteínas reguladoras do ciclo celular p27 e p57 são seus alvos. Portanto, quando há um aumento da expressão de hsa-miR-221 e hsa-miR-222 significa que estas proteínas quinases dependentes de ciclinas encontram-se diminuídas, levando ao aumento na proliferação de células malignas (LE SAGE et al., 2007). Recentemente, Medina et al. (2008) também corroboraram a atuação do hsa-miR 221 e 222 no processo de regulação da p27 e p57. Porém, demonstraram que estes miRNAs necessitam de um microambiente favorável para ter potencial oncogênico, pois altos níveis de expressão de hsa-miR-221 e hsa-miR-222, associados com a falta de fatores de crescimento, faz com que a célula entre em processo de apoptose. Na infecção pelo HTLV-1, ocorre um prolongamento da fase G1 do ciclo celular, devido à ação da proteína Tax. Em experimentos com transdução do gene *tax* em linhagem de osteosarcoma humana (HOS), foram

observados diminuição da expressão dos níveis de p21 e p27, desenvolvimento de anormalidades mitóticas e acúmulo de mutações cromossomais. Sugere-se que essas alterações estejam correlacionadas com a modulação da via da Akt pela proteína Tax, por mecanismos que podem envolver a via PI3K (LIU et al., 2008). Nossos dados demonstram que o grupo HAM apresenta discreto aumento da expressão do hsa-miR-221 e aumento mais evidente da expressão do hsa-miR-222. Apesar destes valores não serem estatisticamente significativos, é possível sugerir que se encontram condizentes com a literatura, a qual relata a expressão destes miRNAs como sendo inversamente proporcional em relação à expressão de p27. Como esta proteína quinase pode sofrer regulação pela proteína Tax, cuja tradução está aumentada em pacientes portadores da mielopatia, investigações futuras mais aprofundadas são importantes para correlacionar a alteração da proteína p27 em pacientes HTLV-1 com a expressão elevada de hsa-miR-221 e 222.

Enquanto estudos mostram a importância destes miRNAs para ativação do ciclo celular, o hsa-miR-142-5p e miR-26a podem estar envolvidos em diversos eventos relacionados com senescência e apoptose, uma vez que ambos podem regular negativamente o fator de transcrição c-Myc (SANDER et al., 2008; XU & LI, 2007). Em células infectadas pelo HTLV-1, este gene está hiperexpresso, pois a proteína Tax regula o fator NF- κ B, que por sua vez, ativa a transcrição de c-Myc. Este, por sua vez, atua na imortalização das células infectadas pelo aumento da expressão da enzima telomerase (BELLON & NICOT, 2008). Nossos resultados apresentaram uma diminuição do hsa-miR-142-5p nos pacientes, enquanto a expressão de hsa-miR-26a foi semelhante entre os grupos. Estes achados condizem parcialmente com nossa hipótese, uma vez que os resultados esperados seriam uma diminuição significativa destes miRNAs, visto que conforme relatos da literatura as células infectadas pelo HTLV-1 apresentam expressão de c-Myc significativamente aumentada e este, por sua vez, apresenta expressão inversamente proporcional aos miRNAs analisados.

Com relação ao hsa-miR-29a, outro miRNA validado em nosso estudo, este apresenta como alvo a proteína p85 α e a proteína CDC42, as quais atuam regulando negativamente o fator de transcrição p53. Assim, quando o hsa-miR-29a está hiperexpresso, estas duas proteínas estão diminuídas e p53 consegue modular fatores importantes para destruição de células tumorais, uma vez que atua no reparo de DNA (PARK et al., 2009). Durante o ciclo de divisão celular esta proteína faz uma

verificação quanto à ocorrência de incorporações de bases trocadas no processo de replicação. Uma vez verificada a presença de mutação é função da p53 ativar uma cascata (conhecida como via da p53), a qual impede o processo de mitose para que ocorra reparação das trocas de bases ou indução da morte celular através do processo de apoptose (revisado por DEY et al., 2008). Na infecção pelo HTLV-1, a proteína p53 está inibida em pacientes com ATLL (JUNG et al., 2008; JEONG et al., 2005; TABAKIN-FIX et al., 2005). O mecanismo para este evento não está totalmente elucidado, porém os autores demonstraram que a proteína apresenta correlação negativa com a expressão de NF- κ B. Quando este fator de transcrição é inibido pelo uso de siRNAs, a proteína p53 volta a apresentar níveis normais de expressão. Outra hipótese é que a Tax pode ativar diretamente a proteína p85 α em células infectadas, o que leva à inativação da p53 (BOXUS et al., 2008). Diante destes relatos, nossos resultados demonstraram diminuição da expressão do hsa-miR-29a em pacientes portadores da mielopatia (Figura 25). Apesar dos achados da literatura estarem relacionados com ATLL, a via do NF- κ B também se apresenta ativada em indivíduos HAM/TSP (ASQUITH & BANGHAM, 2008), sugerindo que investigações futuras possam ser realizadas para verificar se em HAM/TSP também ocorre mecanismos de regulação das vias do p53 e possível envolvimento do miRNA.

Quanto ao hsa-miR-374, existem relatos que sua expressão encontra-se aumentada em indivíduos infectados pelo vírus HIV com alta carga viral e baixa contagem de linfócitos T CD4⁺ (HOUZET et al., 2008). Neste trabalho, os autores dividiram os indivíduos infectados em quatro grupos: baixa carga e alta contagem de T CD4⁺, baixa carga e baixa contagem de linfócitos T *helper*, alta carga e alto número de células T CD4⁺ e alta carga e baixo número de linfócitos T CD4⁺. Curiosamente, o hsa-miR-374 só apresentou alteração nos pacientes com estas últimas características, contudo os autores não conseguiram associar os possíveis mecanismos que levam a este evento. Apesar dos nossos resultados não terem mostrado alterações significativas na expressão deste miRNA, este se apresentou levemente diminuído em pacientes, discordando com o achado dos autores. Esperávamos ter encontrado uma expressão aumentada do hsa-miR-374, uma vez que o HTLV-1 é um retrovírus e resultados semelhantes ao dos autores citados acima pudessem ser correlacionados de alguma forma com nossos estudos.

Por fim, validamos o hsa-miR-125b, cujo aumento observado foi significativo para os pacientes quando comparado aos controles ($p=0,0285$). Já as análises dos grupos HAC e HAM demonstraram aumento significativo ($p=0,0312$) comparado ao grupo CT. Com relação ao papel exercido por este miRNA, na modulação de proteínas essenciais para o ciclo celular, ocorre divergência entre alguns autores. Shi et al. (2007) mostram uma hiper-expressão do mesmo em carcinoma de próstata. Estes estudos sugerem que hsa-miR-125b diminui a expressão de Bak-1 ao se ligar no seu RNAm. Bak é uma proteína pró-apoptótica da família Bcl-2, que induz a morte celular pela via mitocondrial (CHIPUK & GREEN, 2008). Nicot et al. (2000) demonstraram que apesar de Bak ser uma proteína pró-apoptótica, esta não apresenta alterações em infecções pelo HTLV-1 (assim como Bad e Bax). Outro trabalho correlacionou altas quantidades de hsa-miR-125b com a baixa fosforilação de proteínas quinases (LI et al., 2008). Quando fosforiladas, estas proteínas atuam positivamente na imortalização e divisão celular. Estes autores evidenciaram que a expressão elevada de hsa-miR-125b é um bom marcador prognóstico em carcinoma hepatocelular. Em infecções pelo HTLV-1, sabe-se que a proteína Tax atua na via do NF- κ B, o que acarreta a fosforilação várias vias de maneira indireta. Por fim, o hsa-miR-125b também está relacionado com a produção da citocina TNF- α (TILI et al., 2007). O RNAm desta proteína pró-inflamatória é alvo do hsa-miR-125b e deste modo as células do sistema imunológico que não estão presentes nos sítios inflamatórios apresentam elevada expressão deste miRNA. Por outro lado, foi observado que os macrófagos ativados por LPS secretam esta citocina e apresenta baixa expressão do hsa-miR-125b. Sabe-se que na infecção pelo HTLV-1 ocorre aumento na produção de proteínas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ (SANTOS et al., 2004). Estes autores demonstraram que quando os indivíduos são separados entre CT, HAC e HAM, os pacientes infectados apresentaram uma maior produção de TNF- α quando comparado aos controles. O grupo de indivíduos com mielopatia aparece com aumento médio de quatro vezes comparado com os controles e duas vezes com o grupo assintomático.

Com relação aos nossos resultados, observa-se que o hsa-miR-125b está aumentado, porém não é possível inferir qual o possível mecanismo que levaria a este aumento. Pode-se sugerir que este miRNA estaria hiperexpresso proporcionalmente em seus alvos, para que a célula hospedeira tentasse controlar a tradução de proteínas endógenas desreguladas pela proteína viral Tax. Como no

HTLV-1 as proteínas quinases estão fosforiladas e os linfócitos infectados produzem proteínas pró-inflamatórias, entre elas TNF- α , é possível sugerir que a infecção viral leva à transcrição de grande quantidade de RNAm. Sabendo que a produção do hsa-miR-125b é controlada pela célula, esta pode regular a tradução destas proteínas, aumentando o miRNA proporcionalmente. Outra hipótese é que este miRNA estaria aumentado, pois a proteína Tax estaria modulando algum fator de transcrição responsável pela expressão deste miRNA. Estudos que desvendem a transcrição de miRNAs estão no início (ZHOU et al., 2007), porém é possível sugerir que o Tax, por ativar diversos fatores de transcrição, possa regular algum capaz de aumentar a expressão do hsa-miR-125b. Para confirmar as hipóteses, estudos futuros com este miRNA serão propostos na tentativa de elucidar possíveis mecanismos que levam ao seu aumento. Até o momento, é possível inferir que o aumento de hsa-miR-125b, assim como aumento ou diminuição de outros miRNAs deste estudo, não estão correlacionados com a CPV nem com a quantidade de Tax, pois não houve resultados significativos na análise não-paramétrica de Spearman.

Asquith & Bangham (2008) demonstraram que a quantidade de células expressando Tax diariamente é baixa (variando entre 0,03% a 3%) e ocorre flutuação da CPV, pois as células infectadas podem sofrer lise pelos linfócitos T CD8⁺. Embora os autores não discordem que altos valores de CPV e a expressão de Tax possam levar ao desenvolvimento de patologias associadas, a dinâmica da infecção demonstra que fatores do hospedeiro também estão envolvidos no desencadeamento da mielopatia. No quadro de HAM/TSP nossos resultados evidenciam que os valores de Tax foram condizentes com a literatura, pois a expressão média entre os pacientes foi de 2,37% e que alguns miRNAs possuem expressão alterada e que no caso do hsa-miR-125b seu aumento é significativo. Como estes miRNAs são produzidos pela célula hospedeira e podem regular diversas vias de sinalização, experimentos futuros que os relacionem com fatores de transcrição que são controladas pela proteína Tax (mesmo quando sua expressão é baixa), são de grande importância para elucidar o mecanismo pelo qual determinadas pessoas desenvolvem a mielopatia e outras não. Portanto, determinar quais miRNAs que se encontram alterados na HAM/TSP e desvendar como esta desregulação pode estar envolvida na progressão da mielopatia são os passos iniciais para novas abordagens terapêuticas. Conforme descrito por Marquez &

McCaffrey (2008), manipular os níveis de expressão de miRNAs humanos deve se tornar uma potente ferramenta gênica no tratamento das diversas infecções virais.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- A análise dos miRNAs *in silico* gerou grande quantidade de resultados e os algoritmos disponíveis atualmente não conseguem prever se um determinado miRNA apresenta-se expresso no tipo celular estudado;
- A carga proviral dos indivíduos é diretamente proporcional à expressão de Tax e a quantificação proteica por citometria de fluxo é comparável àquela obtida pela técnica de *Western blot*;
- Todos os miRNAs analisados apresentaram-se desregulados, destacando-se o hsa-miR-125b, cujo aumento foi significativamente maior no grupo de pacientes quando comparado com o grupo controle;
- Nenhum miRNA analisado apresentou correlação com a expressão de Tax ou com a carga proviral. Contudo, estudos futuros envolvendo vias de sinalização celular que se apresentam desreguladas pela proteína viral, podem contribuir para o entendimento das alterações que foram observadas nos miRNAs.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHUJA, J.; KAMPANI, K.; DATTA, S.; WIGDAHL, B.; FLAIG, K.E.; JAIN, P. Use of human antigen presenting cell gene array profiling to examine the effect of human T-cell leukemia virus type 1 Tax on primary human dendritic cells. **J Neurovirol.**, New York, v. 12 (1), p. 47–59, 2006.
- ALBRECHT, B.; COLLINS, N.D.; NEWBOUND, G.C.; RATNER, L.; LAIRMORE, M.D. Quantification of human T-cell lymphotropic virus type 1 proviral load by quantitative competitive polymerase chain reaction. **J Virol Methods.**, Amsterdam, v. 75, p. 123–140, 1998.
- ARAUJO, A.Q.C. & SILVA, M.T. The HTLV-1 neurological complex. **Lancet Neurol.**, London, v. 5, p. 1068–1076, 2006.
- ASQUITH, B.; BANGHAM, C. R. How does HTLV-I persist despite a strong cell-mediated immune response? **Trends Immunol.**, Oxford, v. 29, p.4–11, 2008.
- ASQUITH, B.; MOSLEY, A.J.; HEAPS, A.; TANAKA, Y.; TAYLOR, G.P.; MCLEAN, A.R.; BANGHAM, C.R. Quantification of the virus-host interaction in human T lymphotropic virus I infection. **Retrovirology**, London, v. 2 (75), p. 1–9, 2005.
- BARTEL, D.P. MicroRNAs: genomics biogenesis, mechanism and function. **Cell**, Cambridge, v. 166, p. 281–379, 2004.
- BELLON, M. & NICOT, C. Central role of PI3K in transcriptional activation of hTERT in HTLV-I-infected cells. **Blood**, New York, v. 112(7), p. 2603–2608, 2008.
- BENTWICH, I. Prediction and validation of microRNAs and their targets. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 579(26), p. 5904–5910, 2005.
- BOHNSACK, M.T.; CZAPLINSKI, K.; GORLICH, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. **RNA**. New York, v. 10, p.185–191, 2004.
- BOXUS, M.; TWIZERE, J.C.; LEGROS, S.; DEWULF, J.F.; KETTMANN, R.; WILLEMS, L. The HTLV-1 Tax interactome. **Retrovirology**, London, Review. v. 14, p. 1–24, 2008.
- BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R.B.; COHEN, S.M. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biol.**, San Francisco, (3):e85, 2005.
- BUSHATI, N. & COHEN, S.M. MicroRNA functions. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, Palo Alto, v. 23, p. 175–205, 2007
- CAI, X.; HAGEDORN, C.H.; CULLEN, B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. **RNA**, New York, v. 10, p. 1957–1966, 2004.
- CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; PROIETTI, F. A. Heterogeneous geographic distribution of HTLV-1 e 2: serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cad Saude Public.**, Rio de Janeiro, v. 21, p. 926–931, 2005.

CÉSAIRE, R.; DEHEÉ, A.; CESAIRE, R.; LEZIN, A.; DESIRE, N.; BOURDONNE, O.; DANTIN, F.; BERA, O.; SMADJA, D.; ABEL, S.; CABIE, A.; SOBESKY, G.; NICOLAS, J.C. Quantification of HTLV type I and HIV type I DNA load in coinfecting patients: HIV type 1 infection does not alter HTLV type I proviral amount in the peripheral blood compartment. **AIDS Res Hum Retroviruses**, New York, v. 17, p.799–805, 2001.

CHEN, C.; RIDZON, D.A.; BROOMER, A.J.; ZHOU, Z.; LEE, D.H.; NGUYEN, J.T.; BARBISIN, M.; XU, N.L.; MAHUVAKAR, V.R.; ANDERSEN, M.R.; LAO, K.Q.; LIVAK, K.J.; GUEGLER, K.J. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 33, e179, 2005.

CHENDRIMADA, T.P.; GREGORY, R.I.; KUMARASWAMY, E.; NORMAN, J.; COOCH, N. NISHIKURA, K.; SHIEKHATTAR, R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature**, London, v. 436, p. 740–744, 2005.

CHIPUK, J.E. & GREEN, D.R. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? **Trends Cell Biol.**, Cambridge, v 18(4), p. 157–164, 2008.

DEY, A.; TERGAONKAR, V.; LANE, D.P. Double-edged swords as cancer therapeutics: simultaneously targeting p53 and NF-kappaB pathways. **Nat Rev Drug Discov.**, London, v. 7(12), p. 1031–1040, 2008.

DENLI, A.M.; TOPS, B.B.; PLASTERK, R.H.; KETTING, R.F.; HANNON, G.J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. **Nature**, London, v. 432, p. 231–235, 2004.

DI LEVA, G.; CALIN, G.A.; CROCE, C.M. MicroRNAs: Fundamental facts and Involvement in Human Diseases. **Birth Defects Res C.**, Hoboken, v. 78, p. 180–189, 2006.

ENRIGHT, A.J.; JOHN, U.; GAUL, U.; TUSCHL, T.; SANDER, S.; MARKS, D.S. MicroRNA targets in *Drosophila* sp. **Genome Biol.**, London, v. 5; R1, 2003.

FERREIRA JR., O. C.; PLANELLES, V.; ROSENBLATT, J. D. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology and pathogenesis. **Blood**, New York, v. 11, p. 91–104, 1997.

FRANCHINI, G. & STREICHER, H. Human T-cell leukemia virus. **Baillieres Clin Haematol.**, London, v. 8(1), p. 131–148, 1995.

GALARDI, S.; MERCATELLI, N.; GIORDA, E.; MASSALINI, S.; FRAJESE, G.V.; CIAFRÈ, S.A.; FARACE, M.G. miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. **J Biol Chem.**, San Francisco, v. 282, p. 23716–23724, 2007.

GADELHA, S.R.; JUNIOR ALCÂNTARA, L.C.; COSTA, G.C.; ACOSTA, A.X.; RIOS, D.; KASHIMA, S.; COVAS, D.T.; GALVÃO-CASTRO, B. Correlation between polymorphisms at interleukin-6 but not at interleukin-10 promoter and the risk of human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Brazilian individuals. **J Med Virol.**, New York, v. 80(12), p. 2141–2146, 2008.

GESSAIN, A.; BARIN, F.; VERNANT, J.C.; GOUT, O.; MAURS, L.; CALENDER, A.; DE THE, G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, London, v ii, p. 407–409, 1985.

GOOF, S.P. *Retroviridae: The retroviruses and their replication*. In: FIELDS, B.N., **Virology**. 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2001, Capítulo 57.

GRAD, Y.; AACH, J.; HAYES, G. D.; REINHART, B. J.; CHURCH, G. M.; RUVKUN, G.; KIM, J. Computational and experimental identification in *C. elegans* microRNAs. **Mol Cell**, Cambridge, v. 11, p. 1253–1263, 2003.

GRIFFITHS-JONES, S.; SAINI, H.K.; VAN DONGEN, S.; ENRIGHT, A.J. miRBase: tools for microRNA genomics. **Nucleic Acids Res.**, London, 36(Database issue):D154-158, 2008.

GRANT, C.; BARMAK, K.; ALEFANTIS, T.; YAO, J.; JACOBSON, S.; WIGDAHL, B. Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. **J Cell Physiol.**, Philadelphia, v. 190, p. 133–159, 2002.

GRASSMAN, R.; BERCHTOLD, S.; RADANT, I.; ALT, M.; FLECKENSTEIN, B.; SODROSKI, J. G.; HASELTINE, W. A.; RAMSTEDT, U. Role of human T cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. **J Virol.**, Baltimore, v. 66, p. 4570–4575, 1992.

GREGORY, R.I.; CHENDRIMADA, T.P.; COOCH, N.; SHIEKHATTAR, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. **Cell**, Cambridge, v. 123, p. 631–640, 2005.

HAKIM, S.T.; ALSAYARI, M.; MCLEAN, D.C.; SALEEM, S.; ADDANKI, K.C.; AGGARWAL, M.; MAHALINGAM, K.; BAGASRA, O. A large number of the human microRNAs target lentiviruses, retroviruses, and endogenous retroviruses. **Biochem Biophys Res Commun.**, New York, v. 369(2), p. 357–362, 2008.

HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K.H.; NAM, J.W.; HEO, I.; RHEE, J.K.; SOHN, S.Y.; CHO, Y.; ZHANG, B.T.; KIM, V.N. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. **Cell**, Cambridge, v. 125, p. 887–901, 2004.

HARIHARAN, M.; SCARIA, V.; PILLAI, B.; BRAHMACHARI, S.K. Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. **Biochem Biophys Res Commun.**, New York, v. 337(4), p. 1214–1218, 2005.

HOUZET, L.; YEUNG, M.L.; DE LAME, V.; DESAI, D.; SMITH, S.M.; JEANG, K.T. MicroRNA profile changes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seropositive individuals. **Retrovirology**, London, v. 5(1) p. 1–18, 2008.

IGAKURA, T.; STINCHCOMBE, J. C.; GOON, P. K.; GRAHAM, P.; TAYLOR, G. P.; WEBER, J. N.; GRIFFITHS, G. M.; TANAKA, Y.; OSAME, M.; BANGHAM, C. R. M. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. **Science**, Washington, v. 299, p. 1713–1716, 2003.

ISHIHARA, S.; OKAYAMA, A.; STUVER, S.; HORINOUCI, H.; SHIOIRI, S.; MURAI, K.; KUBOTA, T.; YAMASHITA, R.; TACHIBANA, N.; TSUBOUCHI, H. et al. Association of HTLV-I antibody profile of asymptomatic carriers with proviral DNA levels of peripheral blood mononuclear cells. **J. Acquir Immune Defic Syndr.**, Hagerstown, v. 7, p.199–203, 1994.

JACOBSON S. Immunopathogenesis of human T cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. **J Infect Dis.** v. 186 Suppl 2, S187-192, 2002.

JEONG, S.J.; PISE-MASISON, C.A.; RADONOVICH, M.F.; PARK, H.U.; BRADY, J.N. Activated AKT regulates NF-kappaB activation, p53 inhibition and cell survival in HTLV-1-transformed cells. **Oncogene**, Hampshire, v. 24(44), p. 6719–6728, 2005.

JONES, K.S.; FUGO, K.; PETROW-SADOWSKI, C.; HUANG, Y.; BERTOLETTE, D.C.; LISINSKI, I.; CUSHMAN, S.W.; JACOBSON, S.; RUSCETTI, F.W. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. **J Virol.**, Baltimore, v. 80(17), p. 8291–8302, 2006.

JOPLING, C. L.; YI, M.; LANCASTER, A. M.; LEMON, S. M.; SARNOV, P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. **Science**, Washington, v. 309, p. 1577–1581, 2005.

JUNG, K.J.; DASGUPTA, A.; HUANG, K.; JEONG, S.J.; PISE-MASISON, C.; GUROVA, K.V.; BRADY, J.N. Small-molecule inhibitor which reactivates p53 in human T-cell leukemia virus type 1-transformed cells. **J Virol.**, Baltimore, v. 82(17), p. 8537–8547, 2008.

KAJIYAMA, W.; KASHIWAGI, S.; IKEMATSU, H.; HAYASHI, J.; NORUMA, H.; OKOCHI, K. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. **J Infect Dis.**, Chicago, v.154(5), p. 851–857, 1986.

KALYANARAMAN, V.S.; SARNGADHARAN, M. G.; GUROFFM, R. A new subtype of HTLV-II associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, Washington, v. 218, p. 571–573, 1982.

KANNAGI, M.; SHIDA, H.; IGARASHI, H.; KURUMA, K.; MURAI, H.; AONO, Y.; MARUYAMA, I.; OSAME, M.; HATTORI, T.; INOKO, H. Target epitope in the Tax protein of human T-cell leukemia virus type I recognized by class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T cells. **J Virol.**, Baltimore, v. 66, p. 2928–2933, 1992.

KASHIMA, S.; ALCANTARA, L.C.; TAKAYANAGUI, O.M.; CUNHA, M.A.; CASTRO, B.G.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S.; ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v. 22(10), p. 953–959, 2006.

KASHIMA, S.; RODRIGUES, E.S.; AZEVEDO, R.; CASTELLI, E.C; MENDES-JUNIOR, C.T.; YOSHIOKA, F.K.N.; SILVA, I.T.; TAKAYANAGUI, O.M.; COVAS, D.T. DC-SIGN (CD209) gene promoter polymorphisms in a Brazilian population and their association with HTLV-1 infection. **J Gen Virol**. In publishing.

KERTESZ, M.; IOVINO, N.; UNNERSTALL, U.; GAUL, U.; SEGAL, E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. **Nat Genet.** v. 39(10), p. 1278-1284, 2007.

KUBOTA, R.; FUJIYOSHI, T.; IZUMO, S.; YASHIKI, S.; MARUYAMA, I.; OSAME, M.; SONODA, S. Fluctuation of HTLV-I proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-I-associated myelopathy. **J Neuroimmunol.**, Amsterdam. v. 42, p.147–154, 1993.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. **Brief Bioinform.**, London, v. 5(2), p. 150–163, 2004.

LAGRENADE, L.; HANCHARD, B.; FLETCHER, V.; CRANSTON, B.; BLATTNER, W. Infective dermatitis of Jamaica children: a marker for HTLV-I infection. **Lancet**, London. v.336, p.1345-1347, 1990.

LAI, E. C. Predicting and validating microRNA targets. **Genome Biol.**, London, v. 4, R42, 2004.

LANDGRAF, P.; RUSU, M.; SHERIDAN, R.; SEWER, A.; IOVINO, N.; ARAVIN, A.; PFEFFER, S.; RICE, A.; KAMPHORST, A.O.; LANDTHALER, M.; LIN, C.; SOCCI, N.D.; HERMIDA, L.; FULCI, V.; CHIARETTI, S.; FOÀ R.; SCHLIWKA, J.; FUCHS, U.; NOVOSÉL, A.; MÜLLER, R.U.; SCHERMER, B.; BISSELS, U.; INMAN, J.; PHAN, Q.; CHIEN, M.; WEIR, D.B.; CHOKSI, R.; DE VITA, G.; FREZZETTI, D.; TROMPETER, H.I.; HORNUNG, V.; TENG, G.; HARTMANN, G.; PALKOVITS, M.; DI LAURO R, WERNET, P.; MACINO, G.; ROGLER, C.E.; NAGLE, J.W.; JU, J.; PAPAVALILIOU, F.N; BENZING, T.; LICHTER, P.; TAM, W.; BROWNSTEIN, M.J.; BOSIO, A.; BORKHARDT, A.; RUSSO, J.J.; SANDER, C.; ZAVOLAN, M.; TUSCHL, T. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. **Cell**, Cambridge, v. 129, p. 1401–1414, 2007.

LE SAGE, C.; NAGEL, R.; EGAN, D.A.; SCHRIER, M.; MESMAN, E.; MANGIOLA, A.; ANILE, C.; MAIRA G.; MERCATELLI, N.; CIAFRÉ, S.A.; FARACE, M.G.; AGAMI, R. Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. **Embo J.**, Oxford, v. 26, p. 3699–3708, 2007.

LEE, B.; TANAKA, Y.; TOZAWA, H: Monoclonal antibody defining tax protein of human T-cell leukemia virus type-I. **Tohoku J Exp Med.**, Sendai, v. 157, p. 1–11, 1989.

LEE E.J.; GUSEV, Y.; JIANG, J.; NUOVO, G.J.; LERNER, M.R.; FRANKEL, W.L.; MORGAN, D.L. POSTIER RG, BRACKETT DJ, SCHMITTGEN, T.D. Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. **Int J Cancer.**, Geneve, v. 120, p. 1046–1054, 2007.

LEE, R.C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementary to *lin-14*. **Cell**, Cambridge, v. 75, p. 843–854, 1993.

LEE, T.; CHAFETS, D.; BUSCH, M.; MURPHY, E. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. **J Clin Virol.**, Amsterdam. v. 31, p. 275–282, 2004.

LEHKY, T.J.; LEVIN, M.C.; KUBOTA, R.; BAMFORD, R.N.; FLERLAGE, A.N.; SOLDAN, S.S.; LEIST, T.P.; XAVIER, A.; WHITE, J.D.; BROWN, M.; FLEISHER, T.A.; TOP, L.E.; LIGHT, S.; MCFARLAND, H.F.; WALDMANN, T.A.; JACOBSON, S. Reduction in HTLV-I proviral load and spontaneous lymphoproliferation in HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients treated with humanized anti-Tac. **Ann Neurol.**, Boston, v. 44, p. 942–947, 1998.

LI, W.; XIE, L.; HE, X.; LI, J.; TU, K.; WEI, L.; WU, J.; GUO, Y.; MA, X.; ZHANG, P.; PAN, Z.; HU, X.; ZHAO, Y.; XIE, H.; JIANG, G.; CHEN, T.; WANG, J.; ZHENG, S.; CHENG, J.; WAN, D.; YANG, S.; LI, Y.; GU, J. Diagnostic and prognostic implications of microRNAs in human hepatocellular carcinoma. **Int J Cancer**, Geneve, v. 123(7), p. 1616–1622, 2008.

LIM, L.P.; GLASNER, M.E.; YEKTA, S.; BURGE, C.B.; BARTEL, D.P. Vertebrate microRNA genes. **Science**, Washington, v. 299, p. 1540, 2003b.

LIU, M.; YANG, L.; ZHANG, L.; LIU, B.; MERLING, R.; XIA, Z.; GIAM, C.Z. Human T-cell leukemia virus type 1 infection leads to arrest in the G1 phase of the cell cycle. **J Virol.**, Baltimore, v. 82(17), p. 8442–8455, 2008.

LUND, E.; GUTTINGER, S.; CALADO, A.; DAHLBERG, J.E.; KUTAY, U. Nuclear export of microRNA precursors. **Science**, Washington, v. 303, p. 95–98, 2004.

MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. New human retroviruses: HTLV-3 and HTLV-4. **Med Trop Marseille**, Marseille, v. 65, p. 525–528, 2005.

MANEL, N.; KINET, S.; KIM, F. J.; TAYLOR, N.; SITBON, M.; BATTINI, J. L. GLUT-1 is the receptor of retrovirus HTLV. **Med Sci.**, Philadelphia, v. 20, p. 277–279, 2004.

MANNS, A.; MILEY, W.J.; WILKS, R.J.; MORGAN, O.S.; HANCHARD, B.; WHARFE, G.; CRANSTON, B.; MALONEY, E.; WELLES, S. L.; BLATTNER, W. A.; WATERS, D. Quantitative proviral DNA and antibody levels in the natural history of HTLV-1 infection. **J Infect Dis.**, Chicago, v. 180, p. 1487–1493, 1999.

MARQUEZ, R.T.; MCCAFFREY, A.P. Advances in MicroRNAs: Implications for Gene Therapists. **Hum Gene Ther.**, New York, v. 19, p. 27–38, 2008.

MAZIÈRE, P.; ENRIGHT, J. Prediction of microRNA targets. **Drug Discov Today**. Oxford, v. 12, p. 452–458, 2007.

MEDINA, R.; ZAIDI, S.K.; LIU, C.G.; STEIN, J.L. VAN WIJNEN, A.J.; CROCE, C.M.; STEIN, G.S. MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. **Cancer Res.**, New York, v. 68(8), p.2773–2780, 2008.

MILEY, W.J.; SURYANARAYANA, K.; MANNS, A.; KUBOTA, R.; JACOBSON, S.; LIFSON, J.D.; WATERS, D. Real-time polymerase chain reaction assay for cell-associated HTLV type I DNA viral load. **AIDS Res Hum Retroviruses.**, New York, v. 16, p. 665–675, 2000.

MOCHIZUKI, M.; ONO, A.; IKEDA, E.; HIKITA, N.; WATANABE, T.; YAMAGUCHI, K.; SAGAWA, K.; ITO, K. HTLV-1 uveitis. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.**, New York, v. 13, p. S50–S56, 1993.

MONTANHEIRO, P.A.; OLIVEIRA A.C.; POSADA-VERGARA, M. P.; MILAGRES, A.C; TAUIL, C.; MARCHIORI, P.E., DUARTE, A.J.; CASSEB, J. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Braz J Med Biol Res.**, São Paulo, v. 38, p. 1643–1647, 2005.

MURPHY, E.L.; FIGUEROA, J.P.; GIBBS, W.N.; BRATHWAITE, A.; HOLDING-COBHAM, M.; WATERS, D.; CRANSTON, B.; HANCHARD, B.; BLATTNER, W.A., Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Ann Intern Med**. Philadelphia, v. 111(7), p. 555–560, 1989.

NAGAI, M.; USUKU, K.; MATSUMOTO, W.; KODAMA, D.; TAKENOUCHI, N.; MORITOYO, T.; HASHIGUCHI, S.; ICHINOSE, M.; BANGHAM, C.R.; IZUMO, S.; OSAME, O. Analysis of HTLV-1 proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-1 carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. **J Neurovirol.**, New York, v. 4, p. 586–593, 1998.

NAGAI, M.; BRENNAN, M.B.; SAKAI, J.A.; MORA, C.A.; JACOBSON, S. CD8⁺ T cells are an reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. **Blood**, New York, v. 98(6), p. 1858–1861, 2001.

NICOT, C.; MAHIEUX, R.; TAKEMOTO, S.; FRANCHINI, G. Bcl-X(L) is up-regulated by HTLV-I and HTLV-II in vitro and in ex vivo ATLL samples. **Blood**, New York, v. 96(1), p. 275–281, 2000.

NISHIOKA, K.; MARUYAMA, I.; SATO, K.; KITAJIMA, I.; NAKAJIMA, Y.; OSAME, M. Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. **Lancet**. London. v. 1, p. 441, 1989.

OMOTO, S.; FUJII, Y.R. Regulation of human immunodeficiency virus 1 transcription by *nef* microRNA. **J Gen Virol.**, London, v. 86, p. 751–755, 2005.

PARK, S.Y.; LEE, J.H.; HA, M.; NAM, J.W.; KIM, V.N. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. **Nat Struct Mol Biol.**, New York, v. 16(1), p. 23–29, 2009.

PFEFFER, S.; ZAVOLAN, M.; GRASSER, F.A.; CHIEN, M.; RUSSO, J.J.; JU, J.; JOHN, B.; ENRIGHT, A.J.; MARKS, D.; SANDER, C.; TUSCHL, T. Identification of virus-encoded microRNAs. **Science**, Washington, v. 304, p. 734–736, 2004.

PFEFFER, S.; SEWER, A.; LAGOS-QUINTANA, M.; SHERIDAN, R.; SANDER, C.; GRASSER, F.A.; VAN DYK, L.F.; HO, C.K.; SHUMAN, S.; CHIEN, M.; RUSSO, J.J.; JU, J.; RANDALL, G.; LINDENBACH, B.D.; RICE, C.M.; SIMON, V.; HO, D.D.; ZAVOLAN, M. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. **Nat Methods**, New York, v. 2, p. 269–276, 2005.

PICHLER, K.; KATTAN, T.; GENTZSCH, J.; KRESS, A.K.; TAYLOR, G.P.; BANGHAM, C.R.; GRASSMANN, R. Strong induction of 4-1BB, a growth and survival promoting costimulatory receptor, in HTLV-1-infected cultured and patients' T cells by the viral Tax oncoprotein. **Blood**, New York, v. 111(9), p. 4741–4751, 2008.

POIEZ, B.J.; RUSCETTI, F.W.I.; GAZDAR, A.F.; BUNN, P.A.; MINUA, J.D.; GALLO, R.C. Detection and isolation of type-C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 77, p. 7415–7419, 1980.

PROIETTI, F.A.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; CATALAN-SOARES, B.C.; MURPHY, E.L. Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. **Oncogene**, Hampshire, v. 24, p. 6058–6068, 2005.

REHMSMEIER, M. Prediction of microRNA targets. **Methods Mol Biol.**, Clifton, v. 342, p. 87–99, 2004.

SANDER, S.; BULLINGER, L.; KLAPPROTH, K.; FIEDLER, K.; KESTLER, H.A.; BARTH, T.F.; MÖLLER, P.; STILGENBAUER, S.; POLLACK, J.R.; WIRTH, T. MYC stimulates EZH2 expression by repression of its negative regulator miR-26a. **Blood**, New York, v. 112(10), p. 4202–4212, 2008.

SANTOS, S.B.; PORTO, A.F.; MUNIZ, A.L.; DE JESUS A.R.; MAGALHÃES, E.; MELO, A.; DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J.; CARVALHO, E.M. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. **BMC Infect Dis.**, London, v. 4, p. 1–8, 2004.

SCARIA, V.; HARIHARAN, M.; MAITI, S.; PILLAI, B.; BRAHMACHARI, S.K. Host-virus interaction: a new role for microRNAs. **Retrovirol.**, London, v. 3(68), p. 1–9, 2006.

SCHWARZ, D.S.; HUTVÁGNER, G.; DU, T.; XU, Z.; ARONIN, N.; ZAMORE, P.D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**. v. 115(2), p. 199-208, 2003.

SCHMITTGEN, T.D.; KENNETH, J.L. Analysis of relative gene expression data using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, San Diego, v. 25, p. 402–408, 2001.

SEIKI, M.; HATTORI, S.; HIRAYAMA, Y.; YOSHIDA, M. HTLV: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 80, p. 3618–3622, 1983.

SETHUPATHY, P.; MEGRAW, M.; HATZIGEORGIOU, A.G. A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. **Nat Methods**, New York, v. 3, p. 881–886, 2006.

SHI, X.B.; XUE, L.; YANG, J.; MA, A.H.; ZHAO, J.; XU M.; TEPPER, C.G.; EVANS, C.P.; KUNG, H.J.; DEVERE WHITE, R.W. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 104(50), p. 19983–19988, 2007.

SONKOLY, E. & PIVARCSI, A. Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases. **J Cell Mol Med**, Bucharest, v. 13(1), p. 24–38, 2009.

TABAKIN-FIX, Y.; AZRAN, I.; SCHAVINKY-KHRAPUNSKY, Y.; LEVY, O.; ABOUD, M. Functional inactivation of p-53 by HTLV-1 Tax protein: mechanisms and clinical implications. **Carcinogenesis**, New York, v. 27(4), p. 673–681, 2005.

TILI, E.; MICHAILLE, J.J.; CIMINO, A.; COSTINEAN, S.; DUMITRU, C.D.; ADAIR, B.; FABBRI, M.; ALDER, H.; LIU, C.G.; CALIN, G.A.; CROCE, C.M. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. **J Immunol**, Baltimore, v. 179(8), p. 5082–5089, 2007.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, London, v. 3(7), RESEARCH0034, 2002.

WOLFE, N.D.; HENEINE, W.; CARR, J.K.; GARCIA, A.D.; SHANMUGAM, V.; TAMOUFE, U.; TORIMIRO, J.N.; PROSSER, A.T.; LEBRETON, M.; MPOUDI-NGOLE, E.; MCCUTCHAN, F.E.; BIRX, D.L.; FOLKS, T.M.; BURKE, D.S.; SWITZER, W.M. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bush meat hunters. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 102(22), p.7994–7999, 2005.

WONG, L.; LEE, K.; RUSSELL, I.; CHEN, C. Endogenous Controls for Real-Time Quantitation of miRNA Using TaqMan® MicroRNA Assays. Catálogo Applied Biosystems, California, 2006.

XIA, X. & XIE, Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. **J Hered**, Baltimore, v. 92(4), p. 371–3733, 2001.

XU, W. & LI, J.Y. MicroRNA gene expression in malignant lymphoproliferative disorders. **Chin Med J (Engl)**. Beijing, v.120(11), p. 996–999, 2007.

YAMANO, Y.; NAGAI, M.; BRENNAN, M.; MORA, C.A.; SOLDAN, S.S.; TOMARU, U.; TAKENOUCHI, N.; IZUMO, S.; OSAME, M.; JACOBSON, S. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). **Blood**, New York, v. 99, p. 88–94, 2002.

YEUNG, M.L.; YASUNAGA, J.; BENNASSER, Y.; DUSETTI, N.; HARRIS, D.; AHMAD, N.; MATSUOKA, M.; JEANG, K.T. Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. **Cancer Res.**, New York, v. 68(21), p 8976–85, 2008.

YEUNG, M.L.; BENNASSER, Y.; MYERS, T.G.; JIANG, G.; BENKIRANE, M.; JEANG, K.T. Changes in microRNA expression profiles in HIV-1-transfected human cells. **Retrovirol.**, London, v. 2, p. 81–89, 2008.

YI, R.; QIN, Y.; MACARA, I.G.; CULLEN, B.R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v. 17, p. 3011–3016, 2003.

YOSHIDA, M.; SEIKI, M.; YAMAGUCHI, K.; TAKATSUKI, K. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell virus in disease. **Proc Natl Acad Sci.**, Washington, v. 77, p. 7415–7419, 1980.

YOUNIS, I & GREEN, P.L. The human T cell leukemia virus Rex protein. **Front Biosci.**, Tampa, v. 10, p. 431–455, 2005.

ZAMORE, P.D. & HALEY, B. Ribo-gnome: the big world of small RNAs. **Science**, Washington, v. 309(5740), p. 1519–1524, 2005.

ZENG, Y.; CULLEN, B.R. Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells. **RNA**, New York, v. 9, p. 112–123, 2003.

ZHANG, B.; PAN, X.; QINGLIAN, W.; COBB, G. P.; ANDERSON, T. A. Computational identification of microRNAs and their targets. **Comput Biol Chem.**, Oxford, v. 30, p. 395–407, 2006.

ZHOU, L.; HE, H.; MI, J.X.; LI, C.; LEE, B.; MI, Q.S. MicroRNA genes. **Ann N Y Acad Sci.**, New York, v. 1150, p. 72–75, 2008.

Apêndice

APÊNDICE I

Alinhamento parcial da região do gene *tax* do HTLV-1 (768 bp). As bases destacadas referem-se às seqüências-alvo encontradas pelos: hsa-miRNA 221, 222, 125b, 149, 26a, 29a. A legenda indica qual miRNA está se ligando no genoma. As regiões com fonte em uma cor e destaque em outra indicam locais onde os alvos se sobrepõem.

[illegible][illegible]

```
#J02029ATK1  GAC TAT  GTT CGG CCC GCC TAC ATC GT C ACG CCC TAC TGG CCA CCT GTC [7434]
#BRRP425      ... ..
#BRRP438      ... ..
#D13784_1     ... ..
#AY563953     ... ..
#AF139170     ... ..
#NC001436     ... ..
#AF259264     ... ..
```

#J02029ATK1	CAG AGC AT	C AGA TCA CCT GGG ACC CCA TCG A	TG GA	C GCG TTA TCG GCT [7482]
#BRRP425				
#BRRP438				
#D13784_1				
#AY563953				
#AF139170				
#NC001436				
#AF259264				

#J02029ATK1	CAG CTC TAC	AGT TCC TTA TCC CTC GAC TCC CC	T CCT TCC CCA CCC AGA	[7530]
#BRRP425		.C.		
#BRRP438		.C.		
#D13784_1				
#AY563953		.C.		
#AF139170				
#NC001436				
#AF259264				

#J02029ATK1	GAA CCT CT	A AGA CCC TCA AGG TCC TTA CCC CGC	CAA TCA CTC ATA CAA	[7578]
#BRRP425				
#BRRP438				
#D13784_1				
#AY563953				
#AF139170				
#NC001436				
#AF259264				

#J02029ATK1	CCC CCA ACA TT	C CAC CCT CCT TCC TCC AGG CCA	TGC GCA AAT ACT CCC	[7626]
#BRRP425				
#BRRP438				
#D13784_1				
#AY563953				
#AF139170				
#NC001436				
#AF259264				

#J02029ATK1	CCT TCC GAA ATG GAT ACA TGG AAC CCA CCC TTG GGC AGC ACC TCC CAA	[7674]
#BRRP425		
#BRRP438		
#D13784_1		
#AY563953		
#AF139170		
#NC001436		
#AF259264		

#J02029ATK1	C	CC TGT CTT TTC CAG ACC CCG GAC T	CC GGC CCC AAA ACC TG	T ACA CCC	[7722]
#BRRP425					
#BRRP438					
#D13784_1					
#AY563953					
#AF139170					
#NC001436					
#AF259264					

#J02029ATK1	TCT GGG GAG GCT CCG TTG TCT GCA TGT ACC TCT ACC AGC TTT CCC CCC	[7770]
#BRRP425		
#BRRP438		
#D13784_1		
#AY563953		
#AF139170		
#NC001436		
#AF259264	.T.	

#J02029ATK1	CCA TCA	CCT GGC CCC TCC TG	C CCC ACG TGA TTT TTT GCC ACC CCG GCC	[7818]
#BRRP425				
#BRRP438				
#D13784_1			.T.	
#AY563953				
#AF139170				
#NC001436			.T.	
#AF259264				