

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4⁺ na
infecção pelo HTLV-1**

Mariana Tomazini Pinto

Ribeirão Preto
2011

Mariana Tomazini Pinto

**Perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4⁺ 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 Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia

Orientadora: Simone Kashima Haddad

Ribeirão Preto

2011

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

PINTO, Mariana Tomazini

Perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4⁺ na infecção pelo HTLV-1.
Ribeirão Preto, 2011.

124 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. HTLV-1. 2. HAM/TSP. 3. *Microarray*. 4. Expressão gênica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Mariana Tomazini Pinto

Título do trabalho: Perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4⁺ 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 Ciências

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 este trabalho:

À Deus, fonte de amor e misericórdia;

Aos meus pais, Sonia e Pedro, pilares de minha existência, pela compreensão e apoio incondicional durante toda minha caminhada.

À minha irmã Marília, melhor irmã, amiga e companheira que eu poderia ter.

Cada conquista em minha vida é um triunfo de vocês.

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus por ser fonte inesgotável de luz que ilumina e guia todos os meus passos e por ter sido sustentação nestes anos de estudo, permitindo que este trabalho chegasse ao fim. Agradeço imensamente pelo dom da vida, renovado a cada provação que se apresenta e nos sonhos que se concretizam, e à Nossa Senhora, minha mãe, por me ouvir, falar ao meu coração e ser minha intercessora junto ao Pai.

Agradeço a minha querida orientadora Prof^a Dr^a Simone Kashima Haddad, exemplo de sabedoria, competência e profissionalismo. Obrigada pelas inúmeras oportunidades a mim concedidas (estágio voluntário, iniciação científica, bolsista e mestrado), pela sua inestimável confiança e amizade. Agradeço também por enriquecer os meus conhecimentos científicos e pelos ensinamentos de vida.

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

Aos pacientes, acompanhados no Ambulatório de Neurologia Tropical do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por terem doado as amostras para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Bioinformática do Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial, ao Daniel Guariz Pinheiro, imprescindível nas análises dos dados gerados neste trabalho. Obrigada pela paciência e dedicação.

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto. À Patrícia Vianna Bonini Palma pela paciência e por todo o auxílio na padronização dos ensaios de citometria de fluxo. E à Camila Cristina de Oliveira Menezes e Daiane Fernanda dos Santos pela disponibilidade em sempre realizar e analisar os meus inúmeros experimentos.

Ao Laboratório de Sorologia do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela realização dos ensaios imunoenzimáticos. Obrigada queridas “sorolets” pelo carinho e atenção com que sempre me atenderam.

Ao Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas, em especial a Amélia Araujo e Rodrigo Alexandre Panepucci pela laboriosa realização das técnicas de microarrays e pelas preciosas sugestões.

Às secretárias Carmen Cecília de Oliva Simão e Dalva Tereza Catto, pela disponibilidade e carinho.

Aos meus companheiros diários do Laboratório de Biologia Molecular: Aline F. Ferreira, Bruno C. Trindade, Evandra S. Rodrigues, Kátia Kaori Otaguiri, Mayra D. de Macedo, Maurício C. R. Júnior, Stetoslav N. Slavov e Virgínia M. D. Wagatsuma. Agradeço pelo agradável convívio, momentos de alegria e descontração, pelas partilhas e discussões em grupo e principalmente pelo apoio científico. Agradeço de maneira especial a doutoranda Tathiane Maistro Malta, amiga, conselheira e exemplo de determinação. Obrigada por ter me acompanhado todo esse tempo, por todos os ensinamentos, pela paciência e carinho.

À Larissa D.F. Nicolete, Maria Fernanda C. Amarante, Rochele A. França e Rodrigo Haddad que por um período fizeram parte do Laboratório de Biologia Molecular e contribuíram para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida para o desenvolvimento desta pesquisa.

À seção de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela competência e auxílio.

Às minhas valiosas amigas: Adriana, Bianca, Bruna, Camila, Fernanda, Lívia, Karla, Pollyanna, por me acompanharem desde o início e torcerem por mim. Obrigada pelos momentos de alegria.

Ao Irmão Cirineu, meu irmão de coração, pela força e incentivo, pelo apoio emocional e incondicional. Obrigada pelas suas preciosas orações.

À todos os servos do Grupo de Oração Filhos da Luz, por estarem sempre intercedendo por mim.

Por fim, agradeço em especial àqueles que sempre me apoiaram incondicionalmente, que apostaram em mim mais do que ninguém e que seguramente são os que mais compartilham da minha alegria: minha família.

Ao meu pai, Pedro, por sempre acreditar em mim e me apoiar em todas as minhas decisões.

À minha tia, Herminia, e a minha avó, Palmira. Agradeço pelo carinho e pela força que me deram.

A minha amada irmã, Marília, meu tesouro e escudo, com quem compartilhei meus momentos de dificuldades e alegrias. Obrigada por estar ao meu lado e ser o meu porto-seguro.

A minha maravilhosa e excelente mãe, Sonia. Exemplo de mulher guerreira e determinada, exemplo de amor e carinho. Não tenho palavras para expressar a gratidão que sinto por ter me apoiado todo esse tempo, pelo amor, preocupação e confiança. Gratidão, eterna gratidão.

Muito obrigada a todos!

“Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar. Dê-me, Senhor, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir”

São Tomás de Aquino

RESUMO

PINTO, M.T. **Perfil de expressão gênica em linfócitos T CD4⁺ na infecção pelo HTLV-1.** 2011. 124f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) está associado etiologicamente à duas principais manifestações clínicas: a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e a mielopatia associada ao HTLV-1 ou paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Apenas 2 a 5% dos indivíduos infectados desenvolvem doenças associadas ao vírus, enquanto a maioria permanece assintomática. A HAM/TSP é uma manifestação inflamatória do sistema nervoso central e o mecanismo pelo qual o HTLV-1 induz o surgimento de HAM/TSP ainda não está totalmente esclarecido. Os linfócitos T CD4⁺ são os principais reservatórios do HTLV-1 *in vivo* e possuem uma participação importante na resposta imunológica dirigida a este retrovírus. Essas células são ativadas precocemente durante a infecção pelo HTLV-1 e auxiliam na resposta dos linfócitos T CD8 citotóxicos (CTLs), bem como na produção de anticorpos. No presente estudo, foi avaliado o perfil de expressão gênica global dos linfócitos T CD4⁺ isolados de portadores assintomáticos (HAC), pacientes com HAM/TSP e de indivíduos saudáveis (CT) por meio da metodologia de *microarray*. Os linfócitos T CD4⁺ utilizados foram isolados por separação imunomagnética e foram realizados *microarrays* de doze amostras individuais: quatro amostras do grupo CT, quatro amostras do grupo HAC e quatro do grupo HAM/TSP. Os dois últimos grupos continham duas amostras com alta e duas com baixa expressão da proteína Tax. As análises de agrupamento hierárquico revelaram que o perfil de expressão gênica dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 difere dos indivíduos do grupo CT pela formação de dois agrupamentos distintos. Ademais, os indivíduos infectados pelo HTLV-1 se agruparam de acordo com o estado clínico e independente da expressão de Tax. Foram realizadas as comparações entre os grupos CT vs. HAC, CT vs. HAM/TSP e HAM/TSP vs. HAC e os dados demonstraram que 221, 254 e 70 genes estavam diferencialmente expressos, respectivamente. Além disso, foram observados 86 genes presentes nas intersecções entre CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP, 25 genes entre CT vs. HAM/TSP x HAM/TSP vs. HAC e apenas um gene entre CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP. Estes genes diferencialmente expressos estavam associados à citocinas, lise e migração celular. Os achados foram validados por PCR quantitativo em um total de 23 indivíduos assintomáticos, 17 com HAM/TSP e 25 indivíduos saudáveis. A validação evidenciou o aumento da expressão dos genes *PXN*, *CXCR4*, *PRF1* e *Foxp3* no grupo HAM/TSP em relação ao grupo HAC, além do aumento de *IL-27* nos indivíduos do grupo HAC comparados com os indivíduos do grupo HAM/TSP. Adicionalmente, foi realizada a quantificação dos níveis protéicos de *PRF1*, *GZMB*, *CXCR4* por citometria de fluxo. Entretanto, nenhuma diferença foi observada entre os diferentes grupos analisados. Ainda, por meio de citometria de fluxo, a população de células CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺, bem como CD4⁺Foxp3⁺ foram analisadas e observou-se maiores níveis de expressão de CD4⁺Foxp3⁺ nos indivíduos infectados pelo HTLV-1. A porcentagem de células CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ não mostrou diferença significativa entre os três grupos comparados. Os resultados evidenciados neste projeto ressaltam a importância das células CD4⁺ no controle da resposta imune contra a infecção pelo HTLV-1. O aumento na expressão gênica de *PXN* e *CXCR4*, que fazem parte da via de sinalização de *CXCR4*, sugere a ocorrência de migração celular nos indivíduos com HAM/TSP, provavelmente para o SNC. Além disso, o aumento das células Treg parecem suprimir a atividade das células T CD8⁺ pela via perforina/granzima, que por sua vez aumentaria a carga proviral, aumentando assim o risco de desenvolvimento de HAM/TSP.

Palavras-chave: HTLV-1. HAM/TSP. *Microarray*. Expressão gênica.

ABSTRACT

PINTO, M.T. **Gene expression profiling in CD4⁺ T-cells in HTLV-1 infection.** 2011. 124f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is etiologically associated with two major diseases: the adult T cell lymphoma/leukaemia (ATLL) and the HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). About 2 to 5% of infected individuals will develop HTLV-1-related diseases, while the majority remains life-long asymptomatic carriers of the virus. HAM/TSP is an inflammatory manifestation of central nervous system and the mechanism involved in HAM/TSP development is not well elucidated. CD4⁺ T cells are the predominant subset of cells infected with HTLV-1 *in vivo* and they are also important as effector cells against the infection. These cells are early activated during infection with HTLV-1 and assist the response of CD8 cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and antibody production. To identify genes differentially expressed among non-infected individuals (CT), asymptomatic (HAC) and HAM/TSP patients we applied the microarray using CD4⁺ T cells isolated from these individuals. The CD4⁺ T lymphocytes were isolated by magnetic cell separation system and twelve samples underwent microarray analysis, as follows: 4 CT, 4 HAC and 4 HAM/TSP samples. Two samples had high tax expression and two samples had low tax expression for both infected groups. The hierarchical clustering analysis showed that the gene expression profile of infected individuals is distinct from healthy individuals because two separate clusters were observed. HTLV-1-infected individuals' clustering meets with patients' clinical status. However, HTLV-1 CD4⁺ T cells clustering did not correlate with Tax protein expression. We found 221 genes differently expressed between CT and HAC groups, 254 genes between CT and HAM/TSP and 70 genes between HAC and HAM/TSP. Moreover, we observed 86 genes differently expressed in the intersections between CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP, 25 genes between CT vs. HAM/TSP x HAM/TSP vs. HAC and only one gene between CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP. These genes were associated with cytokines, cell lysis and cell migration. These results were validated by quantitative PCR in 23 HTLV-1 asymptomatic carriers, 17 patients with HAM/TSP and 25 healthy individuals. The validation revealed increased levels of expression of the genes *PXN*, *CXCR4*, *PRF1*, and *Foxp3* in the HAM/TSP group compared with HAC group. IL-27 gene expression was increased in HAC group when compared with HAM/TSP group. Additionally, we performed the protein quantification of PRF1, GZMB, and CXCR4 by flow cytometry. However, no difference was observed among the three groups. We also analyzed CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ and CD4⁺Foxp3⁺ populations by flow cytometry. There was an increase of CD4⁺Foxp3⁺ expression in HTLV-1-infected individual. No differences were observed in CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ population among the three groups. The results shown in this project highlight the importance of CD4⁺ cells in controlling the immune response against HTLV-1. The gene expression profile of *PXN* and *CXCR4* was increased. These genes are related to CXCR4 signaling pathway that can result in CD4⁺ T cells migration, probably to the central nervous system. It is also suggested that Treg cells can suppress the T CD8⁺ activity through perforin/granzyme pathway. This pathway enhances the proviral load increasing the risk of HAM/TSP development.

Keywords: HTLV-1. HAM/TSP. Microarray. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxograma da estratégia experimental.....	30
Figura 2.	Gráficos de <i>Dot plot</i> demonstrando a pureza das células T CD4 ⁺ isoladas por coluna imunomagnética	38
Figura 3.	Quantificação da expressão da proteína Tax	49
Figura 4.	Quantificação da expressão do receptor de superfície celular CXCR4...	50
Figura 5.	Quantificação da expressão intracelular de Perforina 1 e Granzima B ...	51
Figura 6.	Quantificação da expressão intracelular de Foxp3	53
Figura 7.	Distribuição da carga proviral (n ^o cópias/10 ⁵ células) entre os indivíduos assintomáticos (HAC) e com HAM/TSP	59
Figura 8.	Expressão da proteína Tax nas populações celulares CD4 ⁺ e CD8 ⁺	61
Figura 9.	Demonstração da qualidade de hibridização dos controles positivos	62
Figura 10.	Análise do transcriptoma das células T CD4 ⁺ dos indivíduos sadios e infectados pelo HTLV-1	63
Figura 11.	Comparação do padrão de expressão gênica entre os grupos CT, HAC e HAM/TSP, par a par.....	64
Figura 12.	Diagrama de Venn	65
Figura 13.	Análise dos genes diferencialmente expressos entre as comparações CT vs. HAC e CT vs. HAM/TSP	67
Figura 14.	Análise dos genes diferencialmente expressos entre as comparações CT vs. HAM/TSP e HAM/TSP vs. HAC	68
Figura 15.	Correlação entre os diferentes genes endógenos: ACTB, GAPDH, B2M e RPL13a.....	70
Figura 16.	Validação dos genes IL-27 (A), PXN (B), GZMA (C), GZMB (D), PRF1 (E), CXCR4 (F) e Foxp3 (G) por meio da quantificação relativa por PCR quantitativa	72
Figura 17.	Expressão gênica dos genes IL-27 (A), PRF1 (B), PXN (C), e Foxp3 (D) determinada por PCR quantitativa.....	73
Figura 18.	Correlação entre a expressão dos genes PRF1 e Foxp3 com Tax e CPV	74
Figura 19.	Intensidade média de fluorescência (IMF) de células CD4 ⁺ positivas para CXCR4.....	75
Figura 20.	Frequência e intensidade média de fluorescência (IMF) das células CD4 ⁺ positivas para PRF1 e GZMB	76
Figura 21.	Frequência das células CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{hi} Foxp3 ⁺ e CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	77
Figura 22.	Hipótese do mecanismo de supressão das células T CD8 ⁺ pelas Treg através da via perforina/granzima	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Sequência de <i>primers</i> utilizados para confirmação da infecção pelo HTLV pelo método de PCR	34
Tabela 2.	Sequência de <i>primers</i> para a região <i>tax</i> do genoma viral utilizados para a PCR quantitativa	35
Tabela 3.	Amostras selecionadas para a análise de <i>microarray</i> seguindo os critérios de seleção: alta e baixa expressão de Tax e pureza acima de 90%	40
Tabela 4.	Caracterização dos indivíduos sadios e infectados pelo HTLV-1 em relação à idade e sexo	55
Tabela 5.	Caracterização dos grupos CT, HAC e HAM/TSP quanto ao sexo, idade, contagem global de leucócitos, contagem de linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ e sua razão e pureza das células CD4 ⁺ isoladas.....	57
Tabela 6.	Determinação da carga proviral dos indivíduos infectados pelo HTLV-1	59
Tabela 7.	Funções relacionadas com o gene IL-27, bem como as categorias nas quais estão representadas.....	66
Tabela 8.	Eficiência de amplificação por PCR quantitativa dos genes selecionados para validação, bem como os genes endógenos	69
Tabela 9.	Expressão obtida pela análise de <i>microarray</i> dos genes selecionados para validação. Os valores de <i>fold change</i> são referentes ao segundo grupo analisado.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD	= ácido citrato dextrose
APC	= alofococianina
ATL	= leucemia de células T do adulto
ATLL	= leucemia/linfoma de células T do adulto
BHE	= barreira hemato-encefálica
BSA	= soro albumina bovina
CD	= <i>cluster of differentiation</i>
cDNA	= DNA complementar
cRNA	= RNA complementar
CPV	= carga proviral
Ct	= <i>cycle threshold</i>
CT	= indivíduos sadios
CTL	= linfócitos T citotóxicos
Cy3	= cianina 3
DEPC	= dietil pirocarbato
DMSO	= dimetilsulfóxido
DNA	= ácido desoxirribonucleico
dNTP	= desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DTT	= ditioneitol
Ebi3	= <i>Epstein-baar-induced gene 3</i>
EDTA	= ácido etilenodiamino tetra-acético
FCFRP	= Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FITC	= isotiocianato de fluoresceína
FMRP	= Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FSC	= <i>forward scatter</i>
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
HHV-6	= Herpesvírus Humano 6
HHV-7	= Herpesvírus Humano 7
HIV	= vírus da imunodeficiência humana
HSPGs	= proteoglicanas de heparan sulfato
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

IFN	= interferon
IL	= interleucina
IMF	= intensidade média de fluorescência
IN	= integrase
LTR	= <i>long terminal repeat</i>
pb	= pares de base
PBMC	= células mononucleares do sangue periférico
PBS	= tampão salina fosfato
PCR	= reação em cadeia da polimerase
PE	= ficoeritrina
PEG	= polietilenoglicol
PerCP	= complexo peridina-clorofila
RNA	= ácido ribonucleico
RNAm	= ácido ribonucleico mensageiro
RPMI	= <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SAGE	= <i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SDS	= dodecil sulfato de sódio
SNC	= sistema nervoso central
SSC	= <i>side scatter</i>
<i>tax</i>	= gene regulador de transativação do HTLV-1
Tax	= fosfoproteína transativadora do HTLV-1
T CD4 ⁺	= linfócito T auxiliador
T CD8 ⁺	= linfócito T citotóxico
TNF	= fator de necrose tumoral
TR	= transcriptase reversa
Treg	= célula T regulatória
USP	= Universidade de São Paulo
UV	= ultra-violeta

Nota sobre a nomenclatura de genes

O presente estudo abrange diversos nomes de genes, que foram mantidos em inglês, seguindo a nomenclatura da *Human Genome Organization* (HUGO), como por exemplo: *paxillin* (PXN), *granzyme B* (GZMB) e *Interleukin 27* (IL-27).

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	19
1. Vírus Linfotrópico de Células T Humanas Tipo 1 – Aspectos gerais	19
2. Distribuição geográfica da infecção pelo HTLV-1	19
3. Organização genômica do HTLV-1	20
4. Doenças associadas à infecção pelo HTLV-1	21
4.1 Leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL)	21
4.2 Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espática tropical (HAM/TSP)	22
5. Aspectos imunológicos da infecção pelo HTLV-1	23
6. Sistema nervoso central (SNC) vs. HTLV-1	25
II. OBJETIVOS	28
1. Objetivo Geral	28
2. Objetivos Específicos	28
III. MATERIAIS E MÉTODOS	30
1. Casuística	30
1.1 Aspectos Éticos	31
2. Contagem de células	31
2.1 Hemograma	31
2.2 Contagem de linfócitos CD4 ⁺ e CD8 ⁺	31
3. Sorologia para HTLV-1/2	32
4. Teste molecular - PCR <i>in house</i> para HTLV-1 e HTLV-2	32
4.1 Extração e quantificação de DNA	32
4.2 Reação de amplificação por PCR	33
5. Quantificação absoluta da carga proviral (CPV) por PCR quantitativa	35
6. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico	36
7. Separação imunomagnética de linfócitos T CD4 ⁺	36
7.1 Avaliação da pureza das células isoladas	37
8. Extração e quantificação de RNA	38
9. Análise de expressão gênica global pelo método de <i>microarray</i>	39
9.1 Seleção das amostras	40
9.2 Purificação do RNA total	40
9.2.1 Tratamento com DNase	40
9.2.2 RNA <i>Cleanup</i>	41
9.3 Preparação dos <i>Spikes</i>	41
9.4 Reação de marcação	42

9.5	Quantificação do cRNA.....	42
9.6	Hibridização.....	43
9.7	Lavagem das lâminas de <i>microarray</i>	43
9.8	Escaneamento das lâminas de <i>microarray</i>	44
9.9	Análise dos resultados.....	44
9.9.1	Análises e agrupamento dos dados.....	44
9.9.2	Seleção dos genes diferencialmente expressos e classificação.....	44
10.	Validação dos genes selecionados no <i>microarray</i>	45
10.1	Reação de transcrição reversa.....	45
10.2	Análise da expressão gênica por PCR quantitativa.....	45
10.3	Cálculo da expressão relativa.....	46
10.4	Cálculo da eficiência de amplificação.....	46
11.	Análise de proteínas por citometria de fluxo.....	47
11.1	Análise da expressão intracelular da proteína viral Tax.....	47
11.2	Quantificação da expressão de CXCR4.....	49
11.3	Quantificação da expressão de Perforina 1 e Granzima B.....	50
11.4	Quantificação da expressão de Foxp3.....	52
12.	Análises estatísticas.....	53
IV.	RESULTADOS.....	55
1.	Caracterização dos indivíduos infectados pelo HTLV-1.....	55
2.	Contagem e avaliação da pureza das células CD4 ⁺	56
3.	Quantificação da CPV.....	58
4.	Quantificação da proteína Tax.....	60
5.	Análise dos <i>Microarrays</i>	62
5.1	Qualidade dos <i>microarrays</i>	62
5.2	Agrupamento Hierárquico.....	62
5.3	Seleção dos genes diferencialmente expressos e caracterização quanto as funções biológicas.....	63
5.3.1	Comparação entre os grupos HAC vs. HAM/TSP.....	65
5.3.2	Comparação entre os grupos CT vs. HAC e CT vs. HAM/TSP.....	67
5.3.3	Comparação entre os grupos CT vs. HAM/TSP e HAM/TSP vs. HAC.....	68
6.	Validação dos genes diferencialmente expressos por PCR quantitativa.....	69
7.	Análise da relação de Tax e CPV com os genes selecionados para validação.....	73
8.	Quantificação da expressão de CXCR4.....	74
9.	Quantificação da expressão de Perforina 1 e Granzima B.....	75
10.	Quantificação da expressão de Foxp3.....	76

V. DISCUSSÃO	79
1. Genes associados à citocinas	81
2. Genes associados à migração celular	82
3. Genes associados à lise celular e as células T regulatórias (Treg)	85
VI. CONCLUSÕES	89
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
APÊNDICES.....	105
APÊNDICE A – Lista dos 221 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAC. O grupo CT apresentou 185 genes mais expressos e 36 genes menos expressos comparados com o grupo HAC.	105
APÊNDICE B – Lista dos 254 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAM/TSP. O grupo CT apresentou 171 genes mais expressos e 83 genes menos expressos comparados com o grupo HAM/TSP.	108
APÊNDICE C – Lista dos 70 genes diferencialmente expressos na comparação HAM/TSP vs. HAC. O grupo HAC apresentou 68 genes mais expressos e 2 genes menos expressos comparados com o grupo HAM/TSP.	112
APÊNDICE D – Lista dos 86 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAC com CT vs. HAM/TSP.	113
APÊNDICE E – Lista dos 25 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAM/TSP com HAM/TSP vs. HAC.	116
APÊNDICE F – Gene diferencialmente expresso na comparação CT vs. HAC com HAM/TSP vs. HAC.	117
APÊNDICE G – Comparação dos genes diferencialmente expressos entre grupos CT, HAC e HAM/TSP.	118
ANEXOS	120
ANEXO I - Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa	120
ANEXO II – Termo de consentimento livre e esclarecido dos controles	121
ANEXO III – Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes.....	123

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Vírus Linfotrópico de Células T Humanas Tipo 1 – Aspectos gerais

O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus humano descrito associado à uma doença. Em 1977, no Japão, Uchiyama e colaboradores associaram o vírus à leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e desde então, a mesma tem sido relatada em muitas outras partes do mundo. O HTLV-1 foi isolado pela primeira vez de células T derivadas de linfonodos e linfócitos do sangue periférico de um paciente com linfoma cutâneo (POIESZ et al., 1980). Em 1982, um segundo vírus, o HTLV-2, foi identificado em um paciente com leucemia de células pilosas (KALYANARAMAN et al., 1982). Não há um consenso sobre a origem do HTLV-1 e 2, entretanto, sugere-se que a infecção em humanos se originou na África e foi levada para as ilhas do Caribe pelo tráfico de escravos, e para o Japão pela tripulação africana dos navios portugueses nos séculos XVI e XVII. Recentemente, dois novos tipos foram descritos: HTLV-3 e HTLV-4. Esses dois últimos tipos virais foram descobertos em populações do sul de Camarões que mantêm contato com primatas não-humanos. Entretanto, ainda não foram identificadas as formas de transmissão e se são capazes de desencadear doenças em seus portadores (CALATTINI et al., 2005; WOLFE et al., 2005).

2. Distribuição geográfica da infecção pelo HTLV-1

Dentre todos os tipos citados do HTLV, o HTLV-1 é o mais disseminado e estima-se que 10 a 25 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo (DE THE & BOMFORD, 1993). Entretanto, a prevalência exata é desconhecida, pois os dados são obtidos de populações específicas como candidatos a doações de sangue e mulheres grávidas (PROIETTI et al., 2005)

A prevalência varia de acordo com a área geográfica e são consideradas áreas de alta endemicidade para o HTLV-1 o sudoeste do Japão, ilhas do Caribe, América do Sul e a África equatorial. O Japão foi a primeira região a ser identificada como endêmica, com taxas de prevalência que variam de 0 a 37% (YAMAGUCHI, 1994; MUELLER, 1991).

A infecção pelo HTLV-1 é relatada em todos os países sul-americanos. O Brasil, em decorrência à extensão territorial e ao tamanho da população, é considerado o país com

o maior número absoluto de portadores dentre todos os países endêmicos, com aproximadamente 2,5 milhões de pessoas infectadas (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002). Estudos brasileiros realizados entre doadores de sangue mostram taxas de prevalência distintas. A cidade de Salvador tem a prevalência mais elevada (1,35%), que pode ser explicada pelas características sociodemográficas da população que se assemelham às cidades africanas situadas abaixo do Saara (GALVÃO-CASTRO et al., 1997). Em outras cidades, a prevalência para HTLV-1/2 é de 0,33% no Rio de Janeiro, 0,2% em São Paulo, 0,08% em Manaus, 0,33% em Recife e 0,08% em Florianópolis (GALVÃO-CASTRO et al.; 1997; FERREIRA JÚNIOR et al.; 1995). Em Ribeirão Preto, cidade localizada na região noroeste do estado de São Paulo, as doações sororeagentes para HTLV-1/2 foram avaliadas durante um período de 14 anos (1996 a 2009) e a prevalência foi de 0,05% (dados não publicados).

3. Organização genômica do HTLV-1

O HTLV-1 pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus*. O vírus possui um genoma composto por duas fitas simples de RNA e apresenta 9032 pb que contém os genes estruturais *gag*, *pol* e *env*, além da região *pX*, na qual estão contidos os genes regulatórios *tax* e *rex* (SEIKI et al., 1983). Todos esses genes são flanqueados por duas regiões repetidas localizadas nas extremidades do genoma, denominadas LTR (*long terminal repeats*), as quais são essenciais na integração do DNA proviral ao DNA cromossômico do hospedeiro.

Resumidamente, o gene *gag* é responsável pela síntese das proteínas da matriz (p19), do capsídeo (p24) e do nucleocapsídeo (p15). O gene *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa (TR) e a integrase (IN), e por fim o gene *env* transcreve as proteínas do envelope viral. As proteínas regulatórias Tax e Rex, codificadas pela região *pX*, são consideradas essenciais para a replicação do HTLV, regulando, através dos eventos pós-transcricionais, a expressão dos genes virais. Diversos estudos são focados na proteína Tax, uma fosfoproteína transativadora transcricional capaz de estimular a expressão dos genes virais, através de sua interação com fatores celulares e com a região LTR do genoma proviral. Além dessa atividade transativadora, Tax também é capaz de reprimir a expressão ou inativar um conjunto de genes celulares que atuam como inibidores do crescimento celular, podendo inibir o reparo do DNA e os eventos de morte celular programada (FRANCHINI & STREICHER, 1995; YOSHIDA, 2001). Adicionalmente, esta proteína é importante na capacitação das células infectadas em transpor a barreira hemato-encefálica,

ao mesmo tempo em que é o principal alvo da resposta imune celular (JACOBSON et al., 1990; KANNAGI et al., 1991).

4. Doenças associadas à infecção pelo HTLV-1

A maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 (95%) permanece por um longo período como portadores assintomáticos (HAC), enquanto uma pequena parcela da população infectada desenvolve algum tipo de doença, provavelmente dependendo de cofatores (genéticos, demográficos, ambientais e outros) ainda desconhecidos e que poderiam variar de acordo com a localização geográfica. Existem diversas manifestações clínicas associadas, dentre elas polimiosite, artropatia associada ao HTLV-1, dermatite infecciosa, uveíte, Síndrome de Sjögren entre outras (MORGAN et al., 1989; NISHIOKA et al., 1989; LAGRENADE et al., 1990; MOCHIZUKI et al., 1996; MARIETTE et al., 2000). Entretanto, as principais manifestações clínicas causadas pelo HTLV-1 são a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) (UCHIYAMA, 1977), e a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (OSAME et al., 1986). Ambas as manifestações ocorrem aproximadamente em 2-5% da população infectada pelo retrovírus.

4.1 Leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL)

A ATLL é uma doença maligna fatal das células T periféricas e foi a primeira doença humana identificada como causada por um retrovírus.

O HTLV-1 apresenta potencial oncogênico e essa capacidade advém da atividade de suas proteínas regulatórias, principalmente Tax. Essa proteína é capaz de induzir a expressão do genoma viral e de ativar a expressão de genes celulares envolvidos no controle do crescimento celular. A expansão clonal de populações celulares com DNA danificado, com atividade de Tax permitindo novos acúmulos de mutações, levaria a um processo de transformação maligna de algum clone celular, com expansão monoclonal do clone maligno e desencadeamento de ATLL (YOSHIDA, 2001). Entretanto, a proteína Tax sozinha parece não ser suficiente para explicar a leucemia.

A maior incidência de ATLL ocorre em geral após a terceira década de vida, tendo sua expressão máxima em indivíduos de 40 a 70 anos de idade. Isso sugere que, assim como nos outros cânceres humanos, mudanças genéticas e epigenéticas podem

ocorrer para o desenvolvimento de ATLL (OKAMOTO et al., 1989). Devido às diversas características clínicas da ATLL a mesma é classificada em 4 grupos: forma aguda, linfomatosa, crônica e *smoldering* (SHIMOYAMA, 1991) e a sobrevida média desses pacientes são de 6, 10, 24 e 42 meses, respectivamente (BAZARBACHI & HERMINE, 2001). O tratamento para ATLL tem sido insatisfatório, dessa forma estudos clínicos feitos em grupos cooperativos, dado a raridade dessa doença, e o conhecimento detalhado da fisiopatologia são cruciais para a pesquisa de novos agentes e novos métodos terapêuticos.

4.2 Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espática tropical (HAM/TSP)

Em 1985, Gessain e colaboradores observaram que um indivíduo da Martinica, com anticorpos para HTLV-1, era portador da paraparesia espática tropical (TSP). Em 1986, outro grupo de pesquisadores no Japão demonstrou o caráter neurotrópico do HTLV-1, associando-o a mielopatia crônica (HAM) (OSAME et al., 1986). Após a demonstração de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e no líquido de pacientes que apresentavam HAM/TSP nas regiões de Caribe, Colômbia e Japão, concluíram que a TSP e a HAM eram enfermidades relacionadas entre si (ROMAN & OSAME, 1988). Por fim, a relação entre HAM/TSP e HTLV-1 foi mais tarde observada em muitas áreas do mundo (ROMAN & ROMAN, 1988).

A HAM/TSP é uma doença inflamatória crônica e progressiva do sistema nervoso central caracterizada clinicamente por fraqueza dos membros inferiores, distúrbio vesical, dor lombar baixa, formigamento e queimação e sensibilidade vibratória. O curso da doença é variável entre os pacientes, podendo se desenvolver de forma rápida ou muito lentamente (ARAUJO & SILVA, 2006).

A maioria dos estudos genotípicos do HTLV-1 não mostra associação entre as variantes do vírus e o risco de se desenvolver HAM/TSP (ARAUJO & SILVA, 2006; BANGHAM & OSAME, 2005; KASHIMA et al., 2006). Desse modo, alguns fatores relacionados ao hospedeiro podem favorecer o desenvolvimento de HAM/TSP, como: o sexo feminino, a idade avançada (média de 40 anos), uma carga proviral alta e a contaminação pela via sexual (TAKENOUCI et al., 2003; BANGHAM & OSAME, 2005; LIMA et al., 2005). A neuropatia é duas vezes mais frequente em mulheres do que em homens (VERNANT et al., 1987). Os casos de HAM/TSP em pacientes do sexo feminino podem ser diretamente relacionados a uma transmissão mais alta do homem para a mulher do que da mulher para o homem (MURPHY et al., 1989). Outro fator que pode estar relacionado ao desenvolvimento da mielopatia é a baixa eficiência da resposta imunológica do hospedeiro.

Até o presente momento, não estão esclarecidos os mecanismos exatos pelos quais o HTLV-1 induz o desenvolvimento de HAM/TSP. Existem três hipóteses principais para explicar a patogênese dessa doença (IJICHI et al., 1993; JACOBSON, 1996; OSAME, 2002): i) citotoxicidade direta: as células da glia seriam infectadas pelo HTLV-1 e passariam a apresentar antígenos virais em sua superfície celular. Os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) HTLV-1-específicos cruzariam a barreira hemato-encefálica, reconheceriam principalmente a proteína Tax, e destruiriam essas células infectadas através da atividade citotóxica direta ou por liberação de citocinas; ii) autoimunidade: as células da glia possuem antígenos que seriam confundidos com algum antígeno do HTLV-1. Assim, os linfócitos T CD4⁺ reconhecem células da glia normais como células infectadas pelo HTLV-1 e reagem contra essas células acarretando em um processo inflamatório autoimune com lesão neural. iii) dano colateral: linfócitos T CD4⁺ infectados com HTLV-1 e linfócitos T CD8⁺ específicos anti-HTLV-1 atravessariam a barreira hemato-encefálica, se encontrariam no sistema nervoso central e as células da glia seriam destruídas pelas citocinas liberadas pelos CTLs contra as células CD4⁺ infectadas. Dentre todas as hipóteses, a mais sustentada é a do dano colateral. Poucas evidências suportam a primeira hipótese, mas os mecanismos envolvidos nas demais teorias podem estar acontecendo na patogênese da HAM/TSP.

O tratamento para HAM/TSP ainda não é totalmente eficaz, entretanto o uso de corticóides, antivirais, INFs (interferons) são utilizados como estratégias terapêuticas na tentativa de melhorar a infecção.

5. Aspectos imunológicos da infecção pelo HTLV-1

O HTLV-1 é latente na maioria das células T, e desta forma indetectável pelo sistema imune do hospedeiro. Entretanto, a infecção viral induz a ativação de linfócitos os quais respondem através de múltiplos mecanismos da resposta imune celular e humoral (MANNING, 1999). Estudos são realizados para compreender melhor o papel do sistema imunológico no processo de cronicidade diferenciada da infecção pelo HTLV-1. Os mesmos buscam correlacionar fatores ligados aos mecanismos imunopatológicos e imunoprotetores com o desenvolvimento ou manutenção das diferentes formas clínicas da infecção.

Relatos indicam que CTLs HTLV-1-específicas são normalmente abundantes, cronicamente ativadas e principalmente direcionadas a proteína viral Tax (BANGHAM, 2000). Muito se discute sobre o papel das células T CD8⁺ HTLV-1-específicas na tentativa de elucidar se as mesmas contribuem para o processo inflamatório e desmielinização de HAM/TSP ou se o efeito dominante dessas células *in vivo* protege contra a doença. Essa

população celular é responsável em controlar a quantidade de linfócitos T CD4⁺ infectados pelo vírus (BANGHAM, 2000).

Embora o HTLV-1 possa infectar vários tipos de células tais como células dendríticas, linfócitos B, macrófagos e células T, o mesmo infecta preferencialmente células T CD4⁺ (ETOH et al., 1997; RICHARDSON et al., 1990). Isso é explicado pelo fato da eficiência de sua entrada na célula depender de proteoglicanas de heparan sulfato (HSPGs), moléculas que atuam como co-receptores e que estão presentes em grande quantidade na superfície de linfócitos T *helper* (JONES et al., 2006). Dessa forma, os linfócitos T CD4⁺ constituem o principal reservatório do HTLV-1 *in vivo* (RICHARDSON et al., 1990; HANON et al., 2000) e estão precocemente ativados durante a infecção viral auxiliando na resposta dos CTLs, bem como na produção de anticorpos.

O HTLV-1 infecta *in vivo* preferencialmente e persistentemente linfócitos CD4⁺CD25⁺ (YAMANO et al., 2005), os quais compreendem a maioria de células T regulatórias (Treg) Foxp3⁺ (SAKAGUCHI et al., 2006). As Treg são subpopulações especializadas de células T CD4⁺ responsáveis por suprimir a atividade de células T durante a resposta inflamatória. Em pacientes HAM/TSP, a porcentagem de células Treg Foxp3⁺ em CD4⁺CD25⁺ é menor do que nos indivíduos assintomáticos e sadios não infectados (YAMANO et al., 2005; OH et al., 2006), enquanto a porcentagem de células T CD4⁺Foxp3⁺ tenderam a ser maior nos pacientes HAM/TSP do que nos HAC (HAYASHI et al., 2008; TOULZA et al., 2008; BEST et al., 2009)

A frequência das células T CD4⁺Foxp3⁺ HTLV-1 negativa correlaciona-se positivamente com a carga proviral (HAYASHI et al., 2008; TOULZA et al., 2008) e a atividade do CTL correlaciona-se negativamente com a frequência de células CD4⁺ Foxp3⁺ HTLV-1 negativa (TOULZA et al., 2008). Esses dados sugerem que o aumento de células CD4⁺ Foxp3⁺ HTLV-1 negativa é um dos principais determinantes da eficiência das células T no controle da resposta imune contra o HTLV-1. Dessa forma, as células Treg reduzem a atividade das CTLs, que por sua vez aumenta a carga proviral, aumentando assim o risco de desenvolvimento de HAM/TSP.

Goon et al. (2004) e Nose et al. (2007) demonstraram que a frequência total das células T CD4⁺ HTLV-1-específicas foi significativamente maior em pacientes com HAM/TSP do que em portadores assintomáticos (HAC) que apresentavam carga proviral similar. Esta observação sugere que uma expansão mais eficiente das células T CD4⁺ HTLV-1-específicas, independentemente da carga proviral, ocorre em pacientes HAM/TSP. Provavelmente, isto decorre da maior estimulação antigênica crônica que ocorre nestes pacientes em relação aos indivíduos infectados assintomáticos.

Os linfócitos T CD4⁺ predominam no infiltrado celular mononuclear que é encontrado nos estágios iniciais do processo inflamatório na medula espinhal do quadro de

HAM/TSP (UMEHARA et al., 1993) com secreção espontânea de citocinas como IL-1 beta, TNF- α e IFN- γ (UMEHARA et al., 1996).

Deste modo, a importância da infecção de linfócitos T CD4⁺ em indivíduos portadores da mielopatia resume-se em: i) são as células que predominantemente são infectadas pelo HTLV-1; ii) são as responsáveis pelo aumento da carga proviral; iii) são as células que se infiltram no sistema nervoso central; iv) quando infectadas, secretam espontaneamente citocinas como TNF- α e IFN- γ que são encontradas em grande quantidade no líquido de pacientes HAM/TSP (GOON et al., 2004).

Acredita-se que a expressão da proteína viral Tax em linfócitos T CD4⁺ infectados ativa o Fator Nuclear- κ B (NF- κ B), fatores séricos de resposta (SRF) e fatores ativadores de transcrição/proteínas ligantes/proteínas ligantes de elementos de resposta ao AMP-cíclico (ATF/CREB) (JEANG, 2001). Com a alteração destes fatores, as células passam a proliferar espontaneamente, bem como expressar citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão que poderiam favorecer a migração direcionada destes linfócitos infectados para o sistema nervoso central (GRANT et al., 2002).

Esses linfócitos infectados também expressam a proteína Tax, a qual atua imortalizando-os, isso faz com que estes permaneçam no sistema nervoso central indeterminadamente. Assim, a presença de linfócitos T CD4⁺ infectados, imortalizados e ativados, promove a migração e infiltração de monócitos e células T CD8⁺ específicas para antígenos do HTLV-1. A produção de TNF- α e IFN- γ pelos linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1 faz com que macrófagos, linfócitos T citotóxicos e células da glia produzam citocinas exacerbadamente. Como consequência desse ambiente inflamatório, ocorre uma ação neurotóxica, que é uma das principais responsáveis pela desmielinização neural e aparecimento da mielopatia (JACOBSON, 2002).

6. Sistema nervoso central (SNC) vs. HTLV-1

A barreira hemato-encefálica (BHE) é responsável em separar o sangue circulante do parênquima cerebral e é composta por membrana basal, células endoteliais e astrócitos. Estudos relatam que o HTLV-1 pode atravessar essa barreira por migração de linfócitos infectados (CAVROIS et al., 2000) e, assim como acontece na corrente sanguínea, a proliferação das células infectadas dentro do líquido é confrontada por uma intensa imunidade celular anti-HTLV-1.

Durante os primeiros estágios de HAM/TSP, células T CD4⁺, linfócitos B e as células T CD8⁺ se infiltram no SNC em números relativamente iguais. Entretanto, os

estágios posteriores da doença são marcados, em grande parte, pela predominância de células T CD8⁺ específicas que circulam no SNC predominantemente no espaço subaracnóideo e parênquima (UMEHARA et al., 1993; LEVIN & JACOBSON, 1997).

A expressão de Tax e carga proviral foram mais frequentemente encontradas no líquido do que em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) nos indivíduos com HAM/TSP (NAGAI et al., 2001; MORITOYO et al., 1999). Adicionalmente, a taxa de carga proviral (CPV) no líquido está fortemente associada com o quadro clínico progressivo da doença e com o aparecimento recente de HAM/TSP. Esses dados sugerem que os linfócitos infectados migram do sangue periférico para o SNC e que a expressão de Tax no SNC pode induzir uma forte resposta imunológica e subsequente desenvolvimento para HAM/TSP.

Objetivos

II. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Determinar o perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4⁺ isolados a partir de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 por meio da metodologia de *microarray*, e comparar os perfis de expressão gênica entre controles saudáveis, os portadores assintomáticos e pacientes com HAM/TSP, no intuito identificar genes diferencialmente expressos.

2. Objetivos Específicos

- Isolamento das células T CD4⁺ de indivíduos saudáveis e infectados pelo HTLV-1 a partir de células mononucleares de sangue periférico;
- Caracterização dos pacientes quanto à contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ e quantificação da carga proviral;
- Realização dos *microarrays* a partir das células isoladas;
- Análise dos resultados obtidos pelos *microarrays* por meio de ferramentas de bioinformática;
- Identificação e validação de genes de interesse que apresentam expressão diferenciada;
- Associação destes genes com possíveis funções na patogênese da infecção pelo HTLV-1.

Materiais e Métodos

III. MATERIAIS E MÉTODOS

A estratégia experimental foi realizada de acordo com a Figura 1.

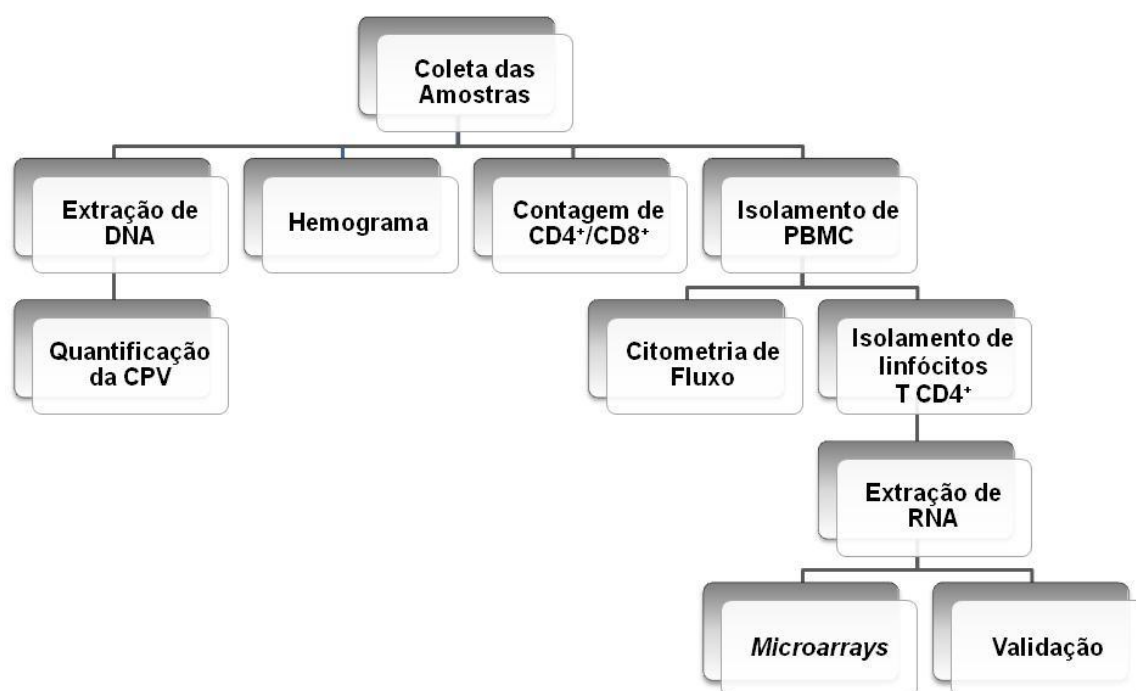


Figura 1 – Fluxograma da estratégia experimental. Todos os procedimentos realizados neste trabalho estão descritos a seguir.

1. Casuística

Foi incluído um total de 47 indivíduos infectados pelo HTLV-1, divididos em dois grupos de acordo com o estado clínico: 26 indivíduos portadores assintomáticos e 21 pacientes com HAM/TSP. Todos os indivíduos incluídos no estudo são acompanhados no Ambulatório de Neurologia Tropical do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP-USP). Esses indivíduos foram avaliados pelo corpo clínico e diagnosticados de acordo com a presença ou ausência de manifestações clínicas associadas ao HTLV-1. Como critérios de inclusão, foram coletadas somente amostras dos

indivíduos que possuíam resultado de sorologia e reação em cadeia da polimerase (PCR) positivos para HTLV-1. Para composição do grupo controle, que inclui indivíduos saudáveis, foram obtidas amostras de sangue de 28 indivíduos soronegativos para HTLV-1/2 obtidas a partir de candidatos voluntários à doação de sangue do Centro Regional de Hemoterapia.

1.1 Aspectos Éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob o número de processo 3083/2007 (Anexo I). Todos os indivíduos saudáveis e pacientes incluídos no estudo foram informados quanto ao procedimento de coleta de amostra biológica, sua utilização no trabalho e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo II e III).

2. Contagem de células

2.1 Hemograma

O hemograma foi realizado no equipamento COULTER® A^c.T diff™ (Beckman Coulter, Fullerton, Califórnia – EUA). O parâmetro avaliado no hemograma foi a série branca, dos indivíduos estudados, cuja contagem deveria se apresentar dentro dos valores de referência: $4,0$ a $11,0 \times 10^3/\text{mm}^3$.

2.2 Contagem de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺

A contagem das células T CD4⁺ e T CD8⁺ foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se o citômetro FACSCalibur (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia - EUA). Para imunofenotipagem, foi utilizado o reagente TriTEST CD4-FITC (FITC: isotiocianato de fluoresceína), CD8-PE (PE: ficoeritrina), CD3-PerCP (PerCP: complexo peridina-clorofila) e tubos TruCOUNT (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia - EUA).

Inicialmente, foram adicionados ao tubo 20 μl do reagente e 50 μl de sangue total, por pipetagem reversa. Em seguida, a amostra foi homogeneizada e incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o tempo determinado, adicionou-se 450 μl de tampão de lise de hemácias *FACS Lysing Solution* (1X) (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia - EUA) e homogeneizou-se bem. As amostras foram novamente incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Por fim, os dados dos experimentos com os linfócitos CD4^+ e CD8^+ foram analisados utilizando o *software* MultiSET (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia - EUA). Foram adquiridos 10.000 eventos e as populações de linfócitos foram selecionadas de acordo com parâmetros de granulosidade (*side scatter* - SSC) (baixa granularidade celular) e pela marcação positiva para CD3. Essas células foram selecionadas para posterior quantificação dos linfócitos CD4^+ e CD8^+ .

3. Sorologia para HTLV-1/2

Após a coleta de sangue dos indivíduos infectados pelo HTLV-1, as amostras de soro foram submetidas ao ensaio imunoenzimático - *ORTHO HTLV-1/2 Ab-capture ELISA test system* (Ortho Clinical Diagnostics INC., Raritan, New Jersey, EUA), conforme as instruções do fabricante. Este teste foi realizado pelo Laboratório de Sorologia do Hemocentro de Ribeirão Preto.

4. Teste molecular - PCR *in house* para HTLV-1 e HTLV-2

4.1 Extração e quantificação de DNA

Para extração do DNA foram utilizados 5 mL de sangue total coletados em tubos com EDTA e utilizou-se o kit *Super Quick Gene DNA isolation* (Analytical Genetic Testing Center – AGTC, Denver, Colorado - EUA), seguindo as instruções do fabricante.

As amostras foram centrifugadas a 1.500 x *g* durante 10 minutos e as células brancas ou *buffy coat* foram coletadas e transferidas para um tubo de polipropileno de 15 mL. Adicionou-se 10 mL de tampão de lise de glóbulos vermelhos (NH_4Cl 0,144 M; NH_4HCO_3 0,01 M) gelado, homogeneizou-se durante 15 minutos em temperatura ambiente,

e centrifugou-se a 1.500 x g durante 20 minutos. Novamente, foi adicionado o tampão de lise de glóbulos vermelhos e seguiu-se o mesmo procedimento. Posteriormente, foram acrescentados 1,5 mL de tampão de lise de glóbulos brancos (fornecido pelo fabricante), homogeneizou-se em agitador mecânico e incubou-se a 55°C durante 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 200 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e 500 µL de reagente precipitante de proteínas, agitou-se, incubou-se a 55°C durante 15 minutos e centrifugou-se a 1.500 x g durante 20 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo. Para a precipitação do DNA, foi adicionado duas vezes o volume obtido de etanol absoluto (Merk, Darmstadt, Hessen - Alemanha). O DNA precipitado foi coletado e transferido para tubo de 1,5 mL estéril. Após a evaporação do etanol, o DNA foi ressuspenso em 200 µL de água estéril tipo 1.

Por fim, o DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria em comprimento de onda de ultravioleta 260 nm (Spectronic 1201, Milton Roy), levando-se em conta que 1 OD₂₆₀ é igual a 50 µg/mL. O DNA extraído foi armazenado em freezer (-20°C).

4.2 Reação de amplificação por PCR

O método de PCR foi utilizado para confirmar as amostras reagentes na sorologia para anti-HTLV-1/2. Foram amplificadas as regiões *tax* e LTR do genoma do HTLV-1 e as regiões LTR, *pxA* e *pxB* do genoma do HTLV-2 utilizando os *primers* descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência de *primers* utilizados para confirmação da infecção pelo HTLV pelo método de PCR.

Tipo Viral	Gene	Posição do Primer	Primer	Sequência (5'-3')
HTLV-1	<i>tax</i>	Externo	PX01	TCG AAA CAG CCC TGC AGA TA
			PX02	TGA GCT TAT GAT TTG TCT TCA
		Interno	PXI01	ATA CAA AGT TAA CCA TGC TT
			PXI03	AGA CGT CAG AGC CTT AGT CT
	LTR	Externo	LTR1	CAT TTC TAC TCT CAC ACG GCC TCA TAC AGA CTC TT
			LTR2	CGC AGT TCA GGA GGC ACC AC
		Interno	LTRN1	GAA CGC GAC TCA ACC GGC GTG GAT
			LTRN2	TTG AAG AAT ACA CCA ACA TCC C
HTLV-2	LTR	Externo	BSQF6	CAG GGC GAG TCA TCG ACC CAA AAG
			BSDR3	GAA GAC AAT GCT CCT AGG GCG GGC
		Interno	BSQF2	ACC GTC TCA CAC AAA CAA TCC C
			BSDR4	GCG GGC CTG CCT ATA GCA ATA
	<i>pxA</i>	Externo	px101	GGC AAT CTC CTA AAA TAG TCT
			px102	TGT GTG TAG GAA CAT TTT GTA
		Interno	px103	TTA CAA TCC TGT CTC CTC TCA
			px104	AAG TTC TTC TAA TCG TTT TAG
	<i>pxB</i>	Externo	px105	GCT TTC CCC ACC CAT GAC ATG
			px106	GGG CCG TGG TTT CAG TTC CTA
		Interno	px107	ACC CCA TGT CAT ATT CTG CCA
			px108	AGC CTT TAC TTG GGA TTG TTT

A reação foi realizada em um volume total de 50 μ L contendo 100-200 ng de DNA genômico, 0.25 pmol de cada *primer*, 0.2 mM de desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dNTP) (Perkin Elmer Cetus, Waltham, Massachusetts - EUA), tampão da PCR contendo $MgCl_2$ (1X) e 1.5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia - EUA) e água para completar o volume final da reação.

As reações foram realizadas em termocicladores GeneAmp[®] PCR system 9600 e GeneAmp[®] PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) e as condições de termociclagem foram: 96 °C durante 5 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 52-61°C durante 1 minuto e 15 segundos, 72°C durante 1 minuto e 50 segundos; e uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

O produto obtido nesta primeira amplificação (3 μ L) foi utilizado para a reação de *nested* PCR, utilizando-se o par de *primers* internos e as mesmas condições de ciclagem. Finalmente, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e revelado por brometo de etídio.

5. Quantificação absoluta da carga proviral (CPV) por PCR quantitativa

A quantificação da CPV foi realizada pelo método de PCR quantitativa utilizando o kit *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

Na reação foram usados 6,25 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 5 µM de *primer forward*, 5 µM de *primer reverse* (*primers* específicos para a região *tax* do genoma viral) (Tabela 2) e 5 µM de sonda específica marcada com o fluorocromo FAMTM (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia - EUA) e 200 ng de DNA genômico. Para o 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).

Tabela 2. Sequência de *primers* para a região *tax* do genoma viral utilizados para a PCR quantitativa (MILEY et al., 2000).

Gene	Primers	Sequência (5'- 3')
<i>tax</i>	HTLV F5	CCC ATC GAT GGA CGC GT
	HTLV R4	CTC CTT CCC CAC CCA GAG AA
	sonda	FAM – CGG CTC AGC TCT ACA G – MGB

F: *primer sense*. R: *primer anti-sense*.

Para a quantificação da CPV é imprescindível a construção da curva padrão. Desse modo, foi utilizada a linhagem MT-2, constituídas de linfoblastos infectados pelo HTLV-1 e que contém 2,4 cópias do gene *tax* por célula (ALBRECHT et al., 1998). A partir dessa informação e sabendo a quantidade exata de células, foi possível obter diluições seriadas para alcançar 10⁵, 10⁴, 10³, 10² e 10¹ cópias de gene *tax*/µL. Tanto as diluições da curva padrão quanto as amostras dos pacientes foram testadas em duplicata.

A reação de amplificação foi submetida aos ciclos: 50°C durante 2 minutos; 95°C durante 10 minutos; e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos/60 °C por 1 minuto. O equipamento utilizado foi o *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia - EUA).

Durante a fase exponencial da amplificação, a curva se torna linear e o *cycle threshold* (Ct), que é o ponto no qual a reação cruza o limiar de detecção (*threshold*), pode ser estabelecido. Isso implica que a cada ciclo, o dobro de *amplicon* é formado e quando realizadas diluições seriadas são mantidas diferenças proporcionais entre os Cts. Dessa forma, construiu-se uma curva padrão por regressão linear para a média de amplificação dos genes alvo e endógeno, ou seja, *tax* e β-actina respectivamente. A partir da média da quantidade destes genes utilizou-se a fórmula a seguir, para a determinação da CPV.

$$\text{CPV (n}^{\circ}\text{cópias/10}^5\text{ células)} = \frac{\text{n}^{\circ}\text{ de cópias de tax}}{\text{n}^{\circ}\text{ de cópias de } \beta\text{-actina}} \times 2 \times 100.000$$

6. Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) foram isoladas utilizando-se o gradiente de densidade pelo método de Ficoll Hypaque™ PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia). Foram coletados 40 mL de sangue periférico em tubos contendo heparina sódica dos indivíduos sadios e dos infectados pelo HTLV-1. Essas amostras foram centrifugadas a 200 x *g* durante 10 minutos a 20°C e após o plasma ser removido, as mesmas foram diluídas na proporção 1:1 (v/v) em PBS 1X em tubos de polipropileno de 50 mL. A seguir, adicionou-se lentamente 15 mL de Ficoll-Paque™ sob o sangue. Para a separação da camada de PBMC, os tubos foram centrifugados a 500 x *g* durante 30 minutos em temperatura ambiente. As células mononucleares estavam presentes no anel formado na interface plasma-Ficoll-Paque™ e foram cuidadosamente coletadas e transferidas para um novo tubo. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com 30 mL de PBS (1X) gelado, para obtenção do precipitado celular, e centrifugadas a 200 x *g* durante 10 minutos. O *pellet* de PBMC foi ressuscitado em 1 mL de PBS (1X) e contado em câmara de Neubauer utilizando corante Turk. Da quantidade total de células obtidas, 2x10⁷ células foram separadas para a realização da coluna imunomagnética e o restante foi criopreservado em 1 mL de soro bovino fetal inativado (Hyclone, Logan Utah - EUA) contendo DMSO a 10% (v/v) (Merck, Darmstadt, Hessen - Alemanha) em nitrogênio líquido, para posterior análise por citometria de fluxo.

7. Separação imunomagnética de linfócitos T CD4⁺

Os linfócitos T CD4⁺ foram isolados e selecionados positivamente em coluna imunomagnética LS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha) a partir de PBMCs. Para tal seleção, foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD4 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha) acoplados à microesferas magnéticas, de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente, as PBMCs foram centrifugadas a 200 x *g* durante 10 minutos e ressuscitadas em tampão de coluna gelado contendo PBS (1X) pH 7.2, 0,5%

soro albumina bovina (BSA) e 2 mM de ácido citrato dextrose (ACD). Para cada 1×10^7 células foram utilizados 80 μL de tampão de coluna gelado e 20 μL do anticorpo anti-CD4 marcado com microesferas magnéticas. Após esta marcação, as células foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos a 4°C . Ainda, as mesmas foram lavadas com 2 mL de tampão de coluna e ressuspendidas em um volume final de 500 μL .

Após a ativação da coluna imunomagnética com 3 mL de tampão de coluna, a suspensão de células foi eluída através da coluna, ficando as células marcadas com anti-CD4 retidas. Para remover as células não ligadas, a coluna foi lavada 3 vezes com 3 mL de tampão de coluna e após o eluído ter sido totalmente desprezado, a coluna foi retirada do campo magnético. Acrescentou-se 5 mL de tampão de coluna para a obtenção das células marcadas com as microesferas magnéticas. Estas foram centrifugadas a $200 \times g$ durante 10 minutos e ressuspendidas em 1 mL de PBS (1X). O rendimento da separação imunomagnética dos linfócitos CD4^+ foi analisado através da contagem de células em câmara de Neubauer. Para avaliação da pureza, $0,4 \times 10^6$ células foram separadas para citometria de fluxo e o restante foi preservado em Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) na proporção 1:4 (v/v) (250 μL de PBS contendo as células + 750 μL de *TRizol*®), para posterior extração de RNA.

7.1 Avaliação da pureza das células isoladas

A pureza das células isoladas na coluna imunomagnética foi avaliada por citometria de fluxo (FACSCalibur) (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia - EUA). Para este experimento, foram utilizados quatro tubos contendo as seguintes marcações: CD4-FITC e CD3-PE (marcadores de linfócitos T CD4^+), CD8-FITC e CD3-PE (marcadores de linfócitos T CD8^+), CD19-PE (marcador de linfócitos B) e CD14-PE (marcador de monócitos) e um tubo controle (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia - EUA). Em cada tubo, foi adicionado 1×10^5 células e 3 μL de cada anticorpo. Após incubação por 15 minutos no escuro e temperatura ambiente, foi adicionado 2 mL de PBS (1X) para lavagem dos anticorpos não ligados e centrifugou-se a $600 \times g$ durante 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspendidas em 200 μL de PBS (1X) para a análise no citômetro de fluxo.

Os dados dos experimentos foram analisados adquirindo-se 10.000 eventos. Estes dados foram plotados em função dos parâmetros de *forward scatter* (FSC), que equivale ao tamanho celular, e de SSC, que corresponde à granularidade. Dessa forma, as populações de linfócitos foram selecionadas e as células de interesse marcadas com os

anticorpos foram lidas gerando um gráfico de pontos (*dot plot*) (Figura 2). No presente estudo, foram incluídas apenas as amostras que possuíram pureza acima de 87%.

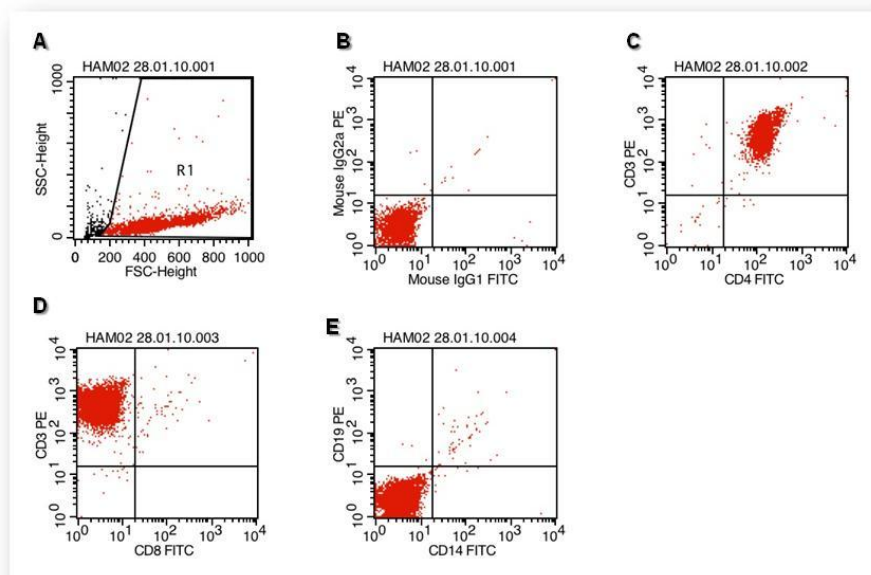


Figura 2. Gráficos de *Dot plot* demonstrando a pureza das células T CD4⁺ isoladas por coluna imunomagnética. **A)** Região 1 (R1) correspondendo às células linfocíticas totais. **B)** Isotipos controle. **C)** Marcação das células duplo-positivas para CD3 e CD4. **D)** Marcação das células positivas para CD3 e negativas para CD8. **E)** Marcação das células CD19 e CD14 negativas.

8. Extração e quantificação de RNA

O RNA total dos linfócitos T CD4⁺ isolados na coluna imunomagnética foi extraído pelo método do *TRIzol® Reagent* (Invitrogen, Carlsbad, California - EUA), segundo instruções do fabricante.

Às células preservadas no *TRIzol®*, descritas no item 7, foi adicionado 100 µg de glicogênio (USB, Cleveland, Ohio, EUA). Homogeneizou-se e incubou-se durante 5 minutos em temperatura ambiente para a dissociação nucleoprotéica. Posteriormente, foi adicionado 250 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Hessen - Alemanha), agitou-se em vórtex por 15 segundos e incubou-se em temperatura ambiente por 5 minutos. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x *g* durante 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a mistura é separada em três fases: a fase aquosa, que contém o RNA, seguida da interface e fase fenol-clorofórmio. A fase aquosa foi separada e transferida para um novo tubo. Foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado (Merck, Darmstadt, Hessen - Alemanha) e as amostras foram incubadas

overnight a -20°C para precipitação do RNA. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a $12.000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C e após desprezar o sobrenadante, foi adicionado $500 \mu\text{L}$ de etanol 70% gelado (v/v) seguido de centrifugação $12.000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C . Os tubos foram deixados abertos durante 15 minutos para secagem do RNA e em seguida o mesmo foi ressuscitado em $20 \mu\text{L}$ de água DEPC (dietil pirocarbonato) e estocado a -80°C .

O RNA foi avaliado quanto à integridade e pureza por meio da análise em gel de agarose 1% (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) corados com brometo de etídio. Dessa forma, foi possível a identificação das bandas 28S e 18S do RNA através do transiluminador sob luz ultravioleta (UV). O RNA também foi quantificado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (Spectronic 1201, Milton Roy), considerando-se que 1 OD_{260} é igual a $40 \mu\text{g/mL}$.

9. Análise de expressão gênica global pelo método de *microarray*

A técnica de *microarray* surgiu em meados da década de 1990 (SCHENA et al., 1995; SHALON et al., 1996) e desde então tem sido amplamente utilizada em pesquisas de Biologia Molecular com o objetivo de medir os níveis de expressão de milhares de genes em uma determinada condição biológica. Esse experimento consiste basicamente na hibridização por complementariedade dos ácidos nucleicos e no fato de pequenos oligonucleotídeos marcados por fluorescência estarem aderidos em posições específicas da lâmina de *microarray* e apresentarem sequências similares às dos genes de interesse, e complementares às sequências do RNA mensageiro (RNAm).

No presente trabalho, a análise do perfil de expressão gênica dos linfócitos T CD4^+ dos indivíduos sadios e infectados pelo HTLV-1 foi realizada por meio da plataforma comercial Agilent® de *microarrays* de oligonucleotídeos utilizando o kit *One-Color Microarray-Based Gene Expression (Quick Amp Labeling)* (Agilent, Santa Clara, Califórnia - EUA) contendo sequências de aproximadamente 44.000 transcritos de genes. Para a realização da técnica de *microarray* foi utilizado $1 \mu\text{g}$ de RNA total para cada amostra. Posteriormente, adicionou-se um controle interno de reação em cada amostra, que foram transcritas em DNA complementar (cDNA) e em seguida amplificadas pela enzima T7 RNA polimerase em RNA complementar (cRNA), incorporando o fluorocromo cianina 3 (Cy3). O cRNA marcado foi colocado na lâmina de *microarray* para hibridização e posteriormente a mesma foi incubada, lavada e escaneada para obtenção dos dados.

9.1 Seleção das amostras

Foram selecionadas 4 amostras de linfócitos T CD4⁺ de cada grupo: assintomático, HAM/TSP e controle. Nos grupos dos indivíduos infectados com HTLV-1 foram selecionados 2 amostras com alta expressão de Tax e consequentemente alta expressão de CPV e 2 amostras com baixa expressão de Tax e consequentemente baixa expressão de CPV. Todas as amostras continham pureza acima de 90% (Tabela 3).

Tabela 3. Amostras selecionadas para a análise de *microarray* seguindo os critérios de seleção: alta e baixa expressão de Tax e pureza acima de 90%.

Clínica	Expressão de Tax em CD4 ⁺	Carga Proviral (n ^o cópias/10 ⁵ cels)	Pureza CD4 ⁺ (%)
HAC 08	8,87	576,85	96,87
HAC 16	0,14	ID	95,22
HAC 19	0,16	124,64	95,02
HAC 21	3,32	ID	95,31
HAM 01	0,44	300,79	94,94
HAM 09	3,66	995,34	96,31
HAM 14	2,97	ID	93,82
HAM 17	0,54	86,44	93,62

HAC: indivíduos assintomáticos. HAM: indivíduos com HAM/TSP. ID: Indetectável

9.2 Purificação do RNA total

9.2.1 Tratamento com DNase

Após a extração de RNA, algumas amostras podem apresentar-se contaminadas com DNA. Para eliminar tal risco, as amostras foram tratadas com a enzima DNase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia – EUA). Na reação para o tratamento com DNase, foram utilizados 2,5 µL de DNase (1U/µL), 10,0 µL de tampão *DNaseI Reaction Buffer* (10X), o

RNA total obtido da extração e água estéril tipo I livre de RNase para um volume final de 100 μ L. A reação foi incubada durante 10 minutos em temperatura ambiente.

9.2.2 RNA Cleanup

O volume das amostras de RNA tratadas com DNase tiveram o volume acertado para 100 μ L e as mesmas foram submetidas à purificação usando o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden – Germany).

Inicialmente, adicionou-se 350 μ L de tampão RLT, homogeneizou-se bem e acrescentou-se 250 μ L de etanol. O volume total foi transferido para a *coluna RNeasy Mini spin* e centrifugou-se a 13.000 x *g* durante 15 segundos. Em seguida, o eluído foi desprezado e adicionou-se 500 μ L do tampão RPE. A coluna foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e novamente o eluído foi descartado. Outra vez, o tampão RPE foi adicionado e centrifugou-se 13.000 x *g* durante 2 minutos. O eluído foi descartado e centrifugou-se a 13.000 x *g* durante 1 minuto para garantir que todo o tampão RPE foi desprezado. Adicionalmente, a coluna foi transferida para um tubo *ependorf* de 1,5 mL e acrescentou-se 30 μ L de água livre de RNase para eluição do RNA retido na coluna. A coluna foi incubada por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugada a 13.000 x *g* durante 1 minuto. O eluído continha o RNA com alto grau de pureza. O RNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm.

9.3 Preparação dos Spikes

Para garantir a qualidade da técnica de *microarray* são utilizados controles positivos, denominados *spikes*. Estes são sequências de RNA que são responsáveis por monitorar todo experimento, desde a amplificação da amostra até a marcação e o processamento dos dados.

Inicialmente, o tubo contendo o estoque dos *spikes* foi aquecido a 37°C durante 5 minutos e homogeneizado. Em seguida, foram feitas três diluições: 1:20 (2,0 μ L da solução estoque + 38,0 μ L de tampão de diluição); 1:25 (2,0 μ L da primeira diluição + 48,0 μ L de tampão de diluição); 1:5 (16,0 μ L da segunda diluição + 64,0 μ L de tampão de diluição). As amostras foram homogeneizadas entre as diluições.

9.4 Reação de marcação

Para a marcação das amostras, o volume do RNA foi acertado com água livre de RNase para um volume de 5,3 μL em tubos de 0,5 μL mantendo a concentração de 1 μg . Em seguida, foram adicionados 5,0 μL de *spike* (terceira diluição), 1,2 μL de *primer* promotor T7, perfazendo um volume final de 11,5 μL . A reação foi incubada a 65°C durante 10 minutos para a desnaturação dos *primers* e das amostras. Em seguida, incubou-se durante 5 minutos em gelo.

A reação de transcrição reversa foi realizada acrescentando aos tubos 4,0 μL de tampão de primeira fita (5X), 2,0 μL de ditioneitol 0,1M (DTT), 1,0 μL de mix de dNTP (10 mM), 1,0 μL de enzima transcriptase reversa MMLV e 0,5 μL da enzima RNase *out*. Posteriormente, as amostras foram incubadas em termociclador sob as temperaturas: 40°C durante 2 horas, 65°C durante 15 minutos e 4°C durante 5 minutos. Após incubação, as amostras foram armazenadas a -20°C por 24 horas.

A reação de marcação do cRNA foi realizada após a síntese da primeira fita. Inicialmente, a solução de polietilenoglicol 50 % (PEG) foi aquecida a 40°C durante 1 minuto. Em seguida, foram adicionados aos tubos 15,3 μL de água livre de RNase, 20,0 μL de tampão de transcrição (4X), 6,0 μL de DTT a 0,1M, 8,0 μL de mix de NTP, 6,4 μL de PEG 50%, 0,5 μL da enzima RNase *out*, 0,6 μL da enzima pirofosfatase inorgânica, 0,8 μL da enzima RNA polimerase T7 e 2,4 μL de CTP marcada com cianina (Cyanine 3-CTP). Incubou-se a 40°C durante 2 horas. Ao fim da marcação, as amostras foram submetidas à purificação (RNA *cleanup*) utilizando-se o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden – Germany), conforme descrito no item 9.2.2.

9.5 Quantificação do cRNA

A incorporação do fluorocromo cianina foi quantificada no equipamento NanoDrop (NanoDrop, Thermo scientific, Wilmington – EUA). Foram determinados os seguintes parâmetros: i) concentração do fluorocromo cianina 3 ($\text{pmol}/\mu\text{L}$), ii) razão de absorvância 260nm/280nm, iii) concentração de cRNA ($\text{ng}/\mu\text{L}$). A quantidade total de cRNA e a atividade específica da cianina foram calculadas pelas seguintes fórmulas:

$$\text{Quantidade total de cRNA } (\mu\text{g}) = \frac{[\text{cRNA}] \times 30}{1.000}$$

$$\text{Atividade específica da cianina (pmol Cy3/\mu\text{g RNA})} = \frac{[\text{cianina}]}{[\text{cRNA}]} \times 1.000$$

Os valores ideais para quantidade total de cRNA é apresentar quantidades maiores que 1,65 μg e para atividade específica da cianina valores acima de 9,0 pmolCy3/ μg cRNA.

9.6 Hibridização

A reação de hibridização foi realizada adicionando-se a um tubo de 1,5 mL: 1,65 μg de cRNA, 11,0 μL de agente bloqueador (10X), 2,2 μL de tampão de fragmentação (25X) e água livre de RNase para um volume final de 55,0 μL . Após incubação a 60°C durante 30 minutos para a fragmentação do cRNA, acrescentou-se 55 μL de tampão de hibridização Hi-RPM GEx (2X) e homogeneizou-se.

As lâminas de *microarray* foram hibridizadas com o auxílio de uma lâmina vedadora denominado *gasket*, com quatro poços correspondentes aos quatro *arrays* da lâmina, e uma câmara de hibridização nomeada *chamber*. A *gasket* foi posicionada na *chamber* e as amostras foram adicionadas lentamente no centro dos poços da *gasket*. Em seguida, após a lâmina de *microarray* ser colocada invertida sobre a *gasket*, a *chamber* foi fechada e incubou-se em forno de hibridização a 65°C, durante 17 horas, 10 rpm.

9.7 Lavagem das lâminas de *microarray*

As lâminas de *microarray* devem ser lavadas após a hibridização para assim serem escaneadas. Foram preparadas três cubas para a lavagem, duas contendo o tampão de lavagem 1 e uma cuba contendo tampão de lavagem 2 aquecido a 37°C. Posteriormente, a *chamber* foi retirada do forno e após ter sido aberta, a *gasket* foi removida com lâmina de *microarray* e transferiu-se para a primeira cuba. Em seguida, a lâmina de *microarray* foi transferida para a segunda cuba e agitou-se por 1 minuto com auxílio de agitador

magnético. A lâmina foi transferida para a terceira cuba que continha o tampão 2 e agitou-se nas mesmas condições anteriores. Finalmente a mesma foi retirada da cuba, armazenada sob abrigo da luz e escaneada imediatamente.

9.8 Escaneamento das lâminas de *microarray*

As lâminas foram escaneadas usando o *software GenePix Pro 6.0* e um scanner no *GenePix 4000B* (Axon Instruments, Foster city, CA, EUA). Os dados foram analisados através do *software Agilent feature extraction (FE)* versão 9.5.1 (Agilent, Santa Clara, California - EUA).

Este *software* permite o reconhecimento dos *spots*, que são pontos específicos nos quais estão aderidos os oligonucleotídeos. Em seguida, é gerado um relatório com diversos parâmetros que estão relacionados com a qualidade dos *microarrays*.

9.9 Análise dos resultados

9.9.1 Análises e agrupamento dos dados

Após o escaneamento e a quantificação da intensidade de fluorescência de cada *spot* realizou-se a normalização dos *microarrays* com o objetivo de tornar as diferentes lâminas comparáveis entre si. O controle de qualidade, a normalização e os parâmetros utilizados para filtrar os dados dos *microarrays* foram realizados utilizando o conjunto de algoritmos contidos no pacote R (<http://www.r-project.org>), *Agi4x44PreProcess*, disponível em <http://bioconductor.org/>. Ainda, nas análises foram retiradas as sondas relacionadas com os cromossomos sexuais X e Y e com anotação cromossômica desconhecida, bem como as sondas anotadas como sendo de proteínas ribossomais.

9.9.2 Seleção dos genes diferencialmente expressos e classificação

Os grupos CT, HAC e HAM/TSP foram comparados utilizando o teste *t* para análise estatística. A comparação foi feita par a par, CT vs. HAC, CT vs. HAM/TSP e

HAM/TSP vs. HAC. Posteriormente a essa análise, os genes que possuíam diferenças de 2-*fold change* e *p value* menor que 0,005 foram selecionados. Após a seleção dos genes diferencialmente expressos, o *software Genesis 1.75*, desenvolvido por Sturn (2000), foi utilizado para as análises de agrupamento *k-means* a fim de identificar genes que compartilhavam os mesmos níveis transcricionais.

A categorização funcional foi realizada com a finalidade de avaliar o papel biológico dos genes diferencialmente expressos. Dessa forma, foram utilizadas as informações providas da plataforma de análises *online Ingenuity Pathway Analysis* (Ingenuity System Inc., Redwood City, Califórnia - EUA).

10. Validação dos genes selecionados no *microarray*

10.1 Reação de transcrição reversa

A transcrição reversa dos RNAs de linfócitos T CD4⁺ foi realizada utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia - EUA). Para um volume final de 50 µL, foram utilizados 5,0 µL de tampão RT (10X); 4,0 µL de mix de dNTP (100 mM); 5,0 µL *random primers* (10X); 0,15 µL de *RNase out*; 125 U da enzima *MultiScribe® MuLV reverse transcriptase*, 2 µg de RNA e água DEPC para ajuste do volume final. A reação foi incubada no termociclador e submetida à temperatura de 25°C durante 10 minutos, seguida de 37°C durante 120 minutos.

10.2 Análise da expressão gênica por PCR quantitativa

Para validar os resultados obtidos no *microarray*, os genes selecionados tiveram sua expressão quantificada por PCR quantitativa. A metodologia proposta foi a quantificação relativa da expressão gênica utilizando o método *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia - EUA) e a plataforma *ABI 7500 Sequence Detection* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia – EUA). Essa plataforma também foi usada para analisar os resultados obtidos após a reação.

Na reação foram utilizados 5,0 μL de *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix* (2X); 0,5 μL de sonda gene-específica (20X); 2,0 μL de cDNA diluído 1:10 (v/v) e água DEPC para um volume final de 10 μL .

Os genes validados neste trabalho foram: *granzyme A* (*GZMA*) (Hs00196206_m1), *granzyme B* (*GZMB*) (Hs00188051_m1), *perforin 1* (*PRF1*) (Hs00169473_m1), *chemokine (C-X-C motif) receptor 4* (*CXCR4*) (Hs00237052_m1), *forkhead box P3* (*FOXP3*) (Hs01085834_m1), *paxillin* (*PXN*) (Hs01104424_m1), *interleukin 27* (Hs00377366_m1). Para a normalização dos genes empregou-se a média geométrica dos Cts dos genes de referência: *β -actina* (*ACTB*) (4326315E), *GAPDH* (4310884-E), *beta-2-microglobulin* (*B2M*) (4333766-0710013) e *ribosomal protein L13a* (*RPL13A*) (185720330-7) (VANDESOMPELE et al., 2002). Todas as reações foram analisadas em duplicata.

10.3 Cálculo da expressão relativa

O nível de expressão dos genes selecionados para validação foi calculado pelo método do $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (PFAFFL, 2001), cuja derivação da fórmula constitui-se dos seguintes passos:

$\Delta\text{Ct} = \text{Ct do gene alvo} - \text{média geométrica dos Cts dos genes de referência}$

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

Expressão Relativa = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

10.4 Cálculo da eficiência de amplificação

A eficiência de amplificação foi determinada para todos os genes quantificados por PCR quantitativa para que o método de quantificação da expressão relativa de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ pudesse ser aplicado.

Inicialmente, foi realizado um *pool* de cDNA das amostras do grupo CT, HAC e HAM/TSP. Em seguida, foi construída uma curva padrão com diluições seriadas de cDNA de razão 10 (1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000). Essas diluições, de concentrações

conhecidas, foram utilizadas na reação de amplificação para todos os genes estudados neste trabalho. As condições desse método já foram descritas no item 10.2.

A eficiência de amplificação de cada gene foi determinada a partir do valor da inclinação da curva, dada pelo *software*, aplicado na fórmula:

$$\text{Eficiência} = 10^{-1/\text{inclinação}} - 1$$

11. Análise de proteínas por citometria de fluxo

11.1 Análise da expressão intracelular da proteína viral Tax

A quantificação da proteína Tax foi realizada nas PBMCs dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 pela técnica de citometria de fluxo, utilizando-se o citômetro FACSCalibur (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia - EUA). Essa quantificação permite a determinação da porcentagem de linfócitos T infectados pelo HTLV-1.

Inicialmente, as PBMCs foram descongeladas em gelo, lavadas com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri - EUA) suplementado com soro fetal bovino inativado a 10% (v/v) (Hyclone, Logan Utah - EUA) e ressuspensas em placas de seis poços contendo 2 mL de meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino inativado a 10% (v/v) acrescido de Concanamicina A (20nM) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri - EUA). As células foram mantidas na incubadora *Steri-cult 200 Thermoform* (Forma Scientific, Marietta, Ohio - EUA) por 12 horas a temperatura de 37°C, 5% CO₂ e 85% de umidade relativa do ar. Após incubação, as mesmas foram lavadas, ressuspensas em 1 mL do meio para contagem em câmara de Neubauer e distribuídas em placa de 96 poços com fundo cônico, contendo 2,5x10⁵ células viáveis por poço. Em seguida, centrifugou-se a placa, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 5 µL de anticorpo de marcação de superfície celular: CD4-PE, CD8-PerCP, CD3-APC (APC: Alofocianina) (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia - EUA). Foi incluído também um poço com isotipos controles. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 20 minutos e decorrido o tempo de incubação, esta foi lavada com 200 µL PBS (1X) para retirada das ligações inespecíficas centrifugando a 300 × g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, adicionou-se 100 µL de PBS (1X), homogeneizou-se bem e centrifugou-se nas mesmas condições anteriores.

Posteriormente, adicionou-se 100 μ L de PBS (1X) acrescido de paraformaldeído 4% (v/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri - EUA) para formalização das amostras. A solução foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As células foram centrifugadas a $1000 \times g$ por 3 minutos e depois lavadas com PBS (1X) contendo soro de cabra 4% (v/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri - EUA). O sobrenadante foi descartado e 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. As células foram incubadas rigorosamente por 7 minutos no escuro e em seguida, estas foram lavadas com 100 μ L de PBS (1X) contendo soro de cabra 4% (v/v) e centrifugadas a $600 \times g$ por 3 minutos.

Os passos seguintes foram adicionar 100 μ L do anticorpo intracelular primário Lt-4, diluído 1:1000 em PBS (1X) contendo soro de cabra 4% (v/v), que foram gentilmente cedido por Dr. Yuetsu Tanaka (University of the Ryukyus, Okinawa, Japão). A reação foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e sob proteção da luz e posteriormente centrifugada $600 \times g$ por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e lavou-se com PBS (1X) contendo soro de cabra 4% (v/v) centrifugando-se a $600 \times g$ por 3 minutos para retirada dos anticorpos que não se ligaram.

Dando continuidade a marcação, foram adicionados 100 μ L de anticorpo secundário anti-IgG3 de camundongo conjugado com o fluorocromo Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia - EUA), diluído 1:500 em PBS (1X) contendo soro de cabra 4% (v/v) em todos os poços da placa. Incubou-se por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, a placa foi lavada duas vezes com 100 μ L de PBS (1X) contendo soro de cabra 4% (v/v) e centrifugada a $600 \times g$ por 3 minutos. Por fim, adicionou-se 100 μ L de PBS (1X) contendo soro de cabra 4% (v/v) para serem analisadas por citometria de fluxo.

Nas análises foram adquiridos 10.000 eventos e as populações de linfócitos (baixo tamanho e complexidade) foram selecionados e plotados em função FSC e SSC (Figura 3). Essa região correspondente aos linfócitos é denominada região 1 (R1). A partir desta região estabeleceu-se uma região 2 (R2) e uma região R3 (R3), as quais contém células positivas para o marcador CD3/CD4 e CD3/CD8, respectivamente. Dentro da associação de R1, R2 e R3, as células que eram positivas para o marcador intracelular Tax foram quantificadas. A porcentagem de células CD3⁺CD4⁺Tax⁺ ou CD3⁺CD8⁺Tax⁺ foi representada em M2 (marca 2) correspondendo à porcentagem de células infectadas pelo HTLV-1.

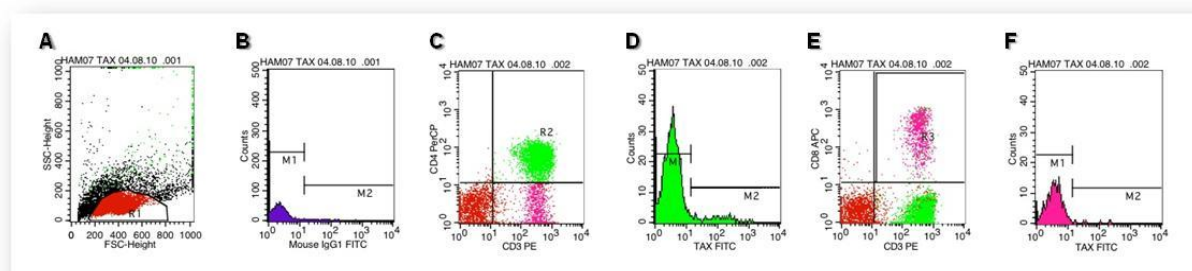


Figura 3. Quantificação da expressão da proteína Tax. **A)** Região R1 correspondendo às células linfocíticas totais. **B)** Isotipos controle. **C)** Região R2 correspondendo às células da região R1 que são positivas para o marcador CD3 e CD4. **D)** Marcação das células CD4 com o anticorpo anti-Tax. **E)** Região R3 correspondendo às células da região R1 que são positivas para o marcador CD3 e CD8. **F)** Marcação das células CD8 com o anticorpo anti-Tax.

11.2 Quantificação da expressão de CXCR4

A expressão do receptor de superfície celular CXCR4 foi quantificada utilizando a metodologia de citometria de fluxo através do citômetro FACSCalibur (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia - EUA).

Para a realização desta técnica, foi utilizado 150 μ L de sangue total e 5 μ L de cada anticorpo de marcação: CD4-FITC, CD3- PerCP e CXCR4-PE (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia - EUA). Foi incluído também, um tubo com isotipos controle. A reação foi incubada durante 15 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de solução de lise de hemácias *FACS Lysing Solution* (1X) (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia – EUA) e incubou-se durante 10 minutos nas mesmas condições anteriores. Após incubação, adicionou-se 1 mL de PBS (1X) para lavagem de anticorpos não ligados e centrifugou-se a 600 \times g durante 3 minutos. Este último procedimento foi realizado por mais duas vezes. As células foram ressuspensas em 200 μ L de PBS (1X) para a análise no citômetro de fluxo.

Foram adquiridos 10.000 eventos e plotados em função FSC e SSC (Figura 4). A população linfocitária (R1) foi selecionada e a partir desta foi estabelecido uma região 2 (R2) contendo células CD4 e CD3 positivas. A quantificação da porcentagem de células marcadas com o anticorpo anti-CXCR4 foi obtida a partir da associação de R1 com R2. Em seguida, foi estabelecida a intensidade média de fluorescência (IMF) desta população, gerando-se um histograma (M2).

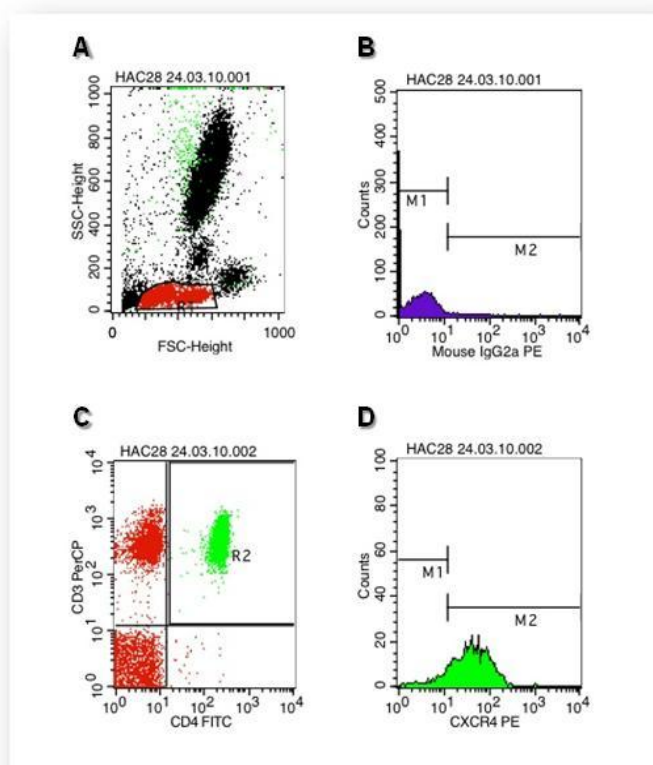


Figura 4. Quantificação da expressão do receptor de superfície celular CXCR4. **A)** Região R1 correspondente à população linfocitária total. **B)** Isotipos controle. **C)** Região R2, com marcação duplo-positiva para CD3 e CD4. **D)** Histograma mostrando a porcentagem de células de R1 e R2 que são positivas para o anticorpo anti-CXCR4 (M2).

11.3 Quantificação da expressão de Perforina 1 e Granzima B

Foi realizada a quantificação da expressão de perforina 1 (PRF1) e granzima B (GZMB) por meio de citometria de fluxo, utilizando-se o citômetro FACSCalibur (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia - EUA).

As PBMCs criopreservadas, descritas no item 6, foram descongeladas em gelo, lavadas com PBS (1X), ressuspendidas neste mesmo tampão e distribuídas em placa de 96 poços com fundo cônico. Cada poço possuía $2,5 \times 10^5$ células viáveis.

O protocolo desta técnica é o mesmo descrito no item 11.1. Inicialmente realizou-se a marcação de superfície celular com os anticorpos CD4-FITC, CD4-PE, CD3-PerCP e após vários procedimentos adicionou-se 5 μ L do anticorpo de marcação intracelular anti-perforina1 marcado com PE ou anti-granzima B marcado com FITC (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia – EUA). Para cada amostra foi usado um tubo controle contendo os

isotipos controle e o específico do anticorpo intracelular (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia – EUA). Os tubos foram incubados durante 30 minutos, lavados 2 vezes com PBS (1X) contendo soro de cabra 4% (v/v) e centrifugado a $600 \times g$ por 3 minutos. Por fim, as células foram ressuspendidas em 200 μL de PBS (1X) contendo soro de cabra 4% (v/v) para a leitura no citômetro de fluxo.

Cerca de 10.000 eventos foram adquiridos e plotados em função de FSC e SSC (Figura 5). Deste modo, a população linfocítica total foi selecionada estabelecendo assim uma região 1 (R1). Em seguida, foi estabelecida uma região 2 (R2), em função das marcações com os anticorpos CD4 e CD3, e que continha as células de interesse. A partir da associação de R1 e R2, foi quantificada a porcentagem de células marcadas com o anticorpo intracelular (anti-PRF1 ou anti-GZMB) bem como foi estabelecida a IMF destas populações, gerando-se histogramas (M2).

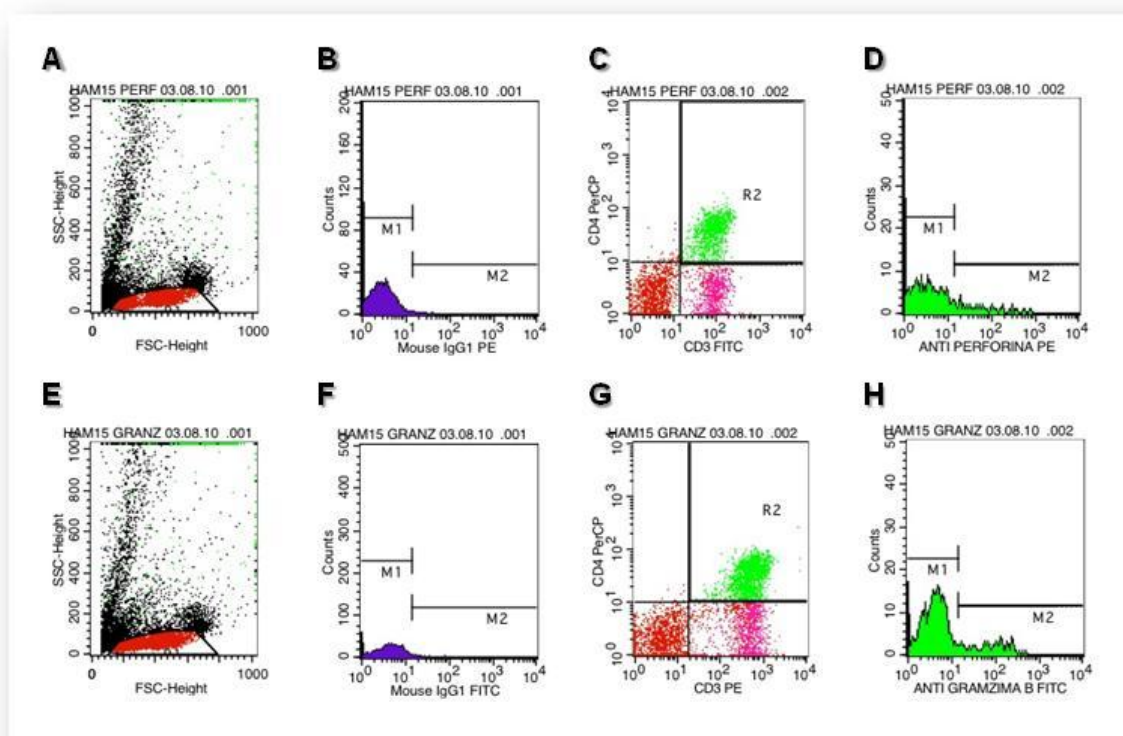


Figura 5. Quantificação da expressão intracelular de Perforina 1 e Granzima B. **A/E)** Região R1 correspondente à população linfocitária total. **B/F)** Isotipos controle. **C/G)** Região R2, com marcação duplo-positiva para CD3 e CD4. **D/H)** Histograma mostrando a porcentagem de células CD3⁺CD4⁺ e que são positivas para os anticorpo anti-PRF1(**D**) ou anti-GZMB (**H**) (M2).

11.4 Quantificação da expressão de Foxp3

A quantificação da expressão de Foxp3 foi realizada por meio de citometria de fluxo, utilizando-se o citômetro FACSCalibur (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia - EUA).

Inicialmente, as PBMCs foram descongeladas em gelo, lavadas com meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri - EUA) suplementado com soro fetal bovino inativado a 10% (v/v) (Hyclone, Logan Utah - EUA) e ressuspensas em PBS (1X). Para cada tubo utilizou-se 2×10^6 células e as mesmas foram marcadas com 5 μ L de cada anticorpo de marcação: CD25-FITC, CD4-PerCP e CD3-APC. A reação foi incubada durante 15 minutos ao abrigo da luz e em temperatura ambiente. Para cada amostra foi utilizado um tubo controle. Posteriormente, adicionou-se 2 mL de PBS (1X) para lavagem e centrifugou-se $600 \times g$ durante 3 minutos. Foram adicionados 1 mL de solução de lise de hemácias *FACS Lysing Solution* (1X) (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia – EUA), incubou-se durante 10 minutos e centrifugou-se nas mesmas condições anteriores. Em seguida, foram adicionados 300 μ L de tampão de permeabilização *FACS Permeabilizing Solution 2* (10x) (BD Biosciences, San Jose, Califórnia – EUA), homogeneizou-se bem, acrescentou-se 5 μ L de anticorpo intracelular Foxp3-PE e as amostras foram incubadas por 10 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Após incubação, adicionou-se 2 mL de PBS (1X) para lavagem e centrifugou-se a $600 \times g$ durante 3 minutos. Este último procedimento foi realizado duas vezes. Por fim, as células foram ressuspensas em 200 μ L de PBS (1X) para a análise no citômetro de fluxo.

Foram adquiridos 100.000 eventos e plotados em função FSC e SSC (Figura 6). Deste modo, a população linfocítica total foi selecionada estabelecendo assim uma região 1 (R1). Em seguida, foi estabelecida uma região 2 (R2), em função da marcação com o anticorpo CD3. A partir da associação de R1 e R2, foi quantificada a porcentagem de células CD4⁺ e CD25^{high} (região 3) gerando-se histogramas (M2). Desta população R3 analisou-se a quantidade de células marcadas com o anticorpo intracelular Foxp3. Ainda, a partir da população linfocitária total estabeleceu-se a porcentagem de células CD4⁺ positivas para Foxp3.

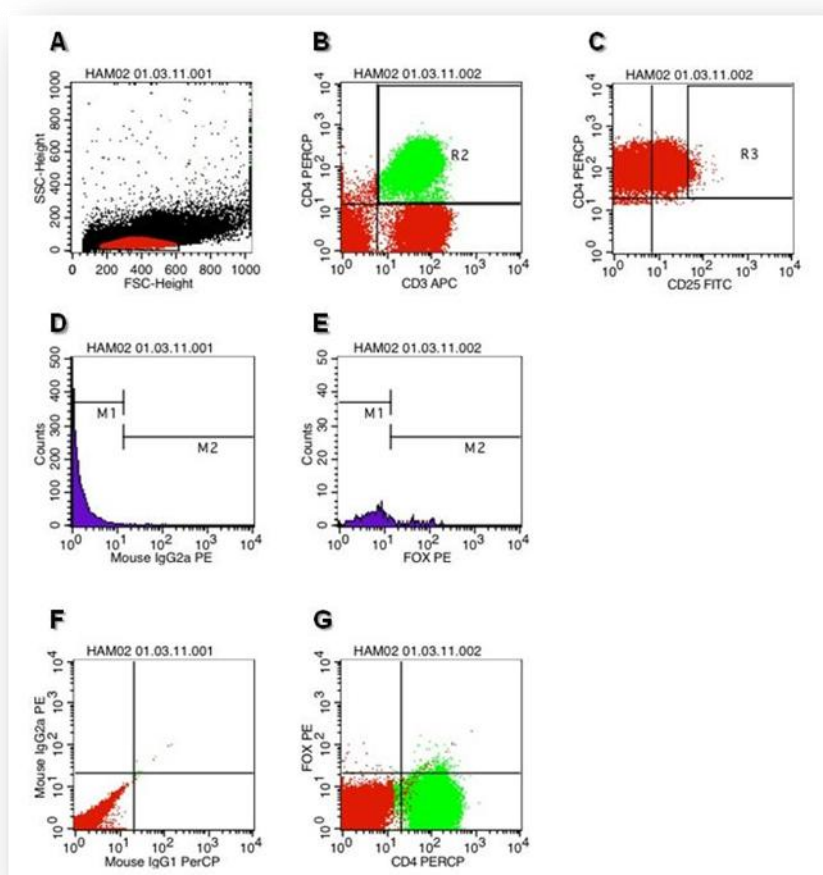


Figura 6. Quantificação da expressão intracelular de Foxp3. **A)** Região R1 correspondente à população linfocitária total. **B)** Região R2, com marcação positiva para CD3. **C)** Região R3, com marcação positiva para CD4⁺ e CD25^{high}. **D/E/F)** Isotipo Controle. **G)** Histograma mostrando a porcentagem de células CD4⁺Foxp3⁺.

12. Análises estatísticas

Os resultados de carga proviral e expressão gênica foram analisados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, unicaudal, considerando-se estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

Para a avaliação da expressão gênica por PCR quantitativa também foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, unicaudal.

A análise de correlação entre as expressões gênicas dos genes utilizados como referência nos cálculos de quantificação relativa foi realizada utilizando-se o teste de correlação não-paramétrico de Spearman e foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

O programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Califórnia, U.S.A.) foi utilizado para realizar todas as análises estatísticas.

Resultados



IV. RESULTADOS

1. Caracterização dos indivíduos infectados pelo HTLV-1

Para a realização deste trabalho, foram coletadas amostras de 75 indivíduos divididos em três grupos: 28 indivíduos sadios (CT), 26 portadores assintomáticos do HTLV-1 (HAC) e 21 pacientes com HAM/TSP. A classificação clínica dos indivíduos infectados com HTLV-1 foi realizada pelo corpo clínico do Ambulatório de Neurologia Tropical do HC-FMRP-USP, levando em consideração os sintomas, sinais e achados laboratoriais relacionados à infecção viral.

Os grupos foram analisados quanto ao sexo e a idade. No grupo CT, dos 28 indivíduos 20 eram do sexo feminino (71,4%) e 8 do sexo masculino (28,6%). Dos 26 pacientes assintomáticos, 15 eram do sexo feminino (57,7%) e 11 do sexo masculino (42,3%); e dos 21 pacientes com HAM/TSP, 16 eram do sexo feminino (76,2%) e 5 do sexo masculino (23,8%) (Tabela 4). As idades nos três grupos variaram de 20 a 76 anos e a maior prevalência foi observada na faixa etária acima dos 50 anos (Tabela 4). Os indivíduos que compuseram o grupo CT tiveram variações na idade de 22 a 76 anos (média de 46,5 anos). A idade dos indivíduos do grupo HAC variou de 20 a 72 anos (média de 42,9 anos) enquanto que no grupo HAM/TSP, a idade variou entre 37 e 74 anos (média de 54,9 anos).

Tabela 4. Caracterização dos indivíduos sadios e infectados pelo HTLV-1 em relação à idade e sexo.

Idade e Sexo	CT	HAC	HAM
18 - 29	4	5	0
30 - 39	5	7	1
40 -49	6	4	5
> 50	13	10	15
Feminino	20	15	16
Masculino	8	11	5
Total	28	26	21

CT: indivíduos sadios. HAC: indivíduos assintomáticos. HAM: indivíduos com HAM/TSP.

2. Contagem e avaliação da pureza das células CD4⁺

As células foram avaliadas utilizando os seguintes parâmetros laboratoriais: hemograma, contagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e razão entre eles.

O valor de referência dos glóbulos brancos no hemograma é de 4.000 a 11.000 células/mm³. No presente estudo, a contagem de leucócitos variou entre 2.800 e 10.900 células/mm³, e a maioria das amostras apresentou-se dentro do valor de referência. Entretanto, seis amostras estavam abaixo destes valores (CT07, CT08, HAC20, HAM03, HAM06 e HAM09).

A contagem de células CD4⁺ variou de 307 a 2497 células/mm³ e as células CD8⁺ de 147 a 1.864 células/mm³. Os valores para a razão CD4⁺/CD8⁺ mantiveram-se entre 0,86 a 12,65. O esperado é obter uma razão acima de 1,2 para evidenciar a qualidade da imunidade adaptativa, entretanto, cinco amostras tiveram valores inferiores (CT16, CT37, CT40, HAM11 e HAM22).

Os valores obtidos da contagem dos leucócitos totais e a razão de células CD4⁺/CD8 foram comparados entre os grupos. Nenhuma diferença estatística foi demonstrada ($p > 0,05$, teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, dados não mostrados).

As células CD4⁺ foram isoladas por coluna imunomagnética e a pureza dessas células foi avaliada por citometria de fluxo. Como observado na Tabela 5, todas as amostras apresentaram pureza acima de 87%.

Tabela 5. Caracterização dos grupos CT, HAC e HAM/TSP quanto ao sexo, idade, contagem global de leucócitos, contagem de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ e sua razão e pureza das células CD4⁺ isoladas.

Clínica	Sexo	Idade	Contagem Global	CD4⁺	CD8⁺	Razão CD4/CD8	Pureza CD4 (%)
CT 01	F	54	5500	643	314	2,05	97.56
CT 03	F	56	4100	736	532	1,38	97.74
CT 04	F	76	5900	1138	593	1,92	98.10
CT 05	F	47	10700	ND	ND	ND	97.42
CT 06	M	37	6800	1007	621	1,62	97.71
CT 07	M	48	3900	979	723	1,35	96.00
CT 08	F	36	3100	867	415	2,09	94.65
CT 09	F	26	7200	902	606	1,49	94.50
CT 10	F	54	8700	2087	423	4,94	95.66
CT 11	M	32	9600	896	597	1,50	88.66
CT 12	M	58	6400	1063	692	1,54	96.42
CT 14	M	28	8000	1178	273	4,32	95.23
CT 15	F	29	8100	736	587	1,25	93.59
CT 16	M	58	8000	1163	1385	0,86	89.70
CT 23	F	52	6200	2314	755	3,06	96.71
CT 24	F	61	8400	1202	433	2,78	92.39
CT 33	F	22	6700	1500	950	1,58	96.57
CT 35	F	51	8000	773	280	2,76	96.69
CT 36	F	55	7800	943	346	2,73	87.56
CT 37	F	60	6300	743	748	0,99	92.56
CT 38	F	49	5400	1169	412	2,84	97.89
CT 39	F	43	10900	1548	445	3,48	95.86
CT 40	M	47	6000	307	261	1,18	95.28
CT 41	F	54	8500	802	389	2,06	96.57
CT 42	F	49	8100	893	359	2,49	94.73
CT 43	M	35	8800	1448	890	1,73	ND
CT 45	F	54	6500	1055	633	1,67	ND
CT 46	F	32	8700	1504	364	4,13	ND
HAC 01	F	55	5900	1204	650	1,85	95.63
HAC 03	F	50	ND	ND	ND	ND	98.62
HAC 04	M	38	6500	ND	ND	ND	97.70
HAC 05	M	30	6200	1568	901	1,74	93.46
HAC 06	M	35	9600	1223	575	2,13	92.84
HAC 08	F	26	5600	1251	760	1,65	96.87
HAC 09	F	47	5900	676	512	1,32	95.81
HAC 10	F	24	8000	690	341	2,02	96.26
HAC 11	M	38	6400	1299	538	2,41	96.72
HAC 12	F	36	10100	958	315	3,04	97.22
HAC 13	F	42	8800	750	552	1,36	92.39
HAC 15	M	53	5800	1142	1120	1,20	89.19
HAC 16	F	55	7100	708	237	2,98	95.22
HAC 17	F	57	5000	1277	545	2,34	95.04
HAC 18	F	22	5700	892	617	1,45	94.58
HAC 19	F	33	4800	1166	274	4,26	95.02
HAC 20	M	45	3200	720	369	1,95	93.83
HAC 21	M	48	6700	327	147	2,22	96.69
HAC 22	M	61	6100	766	357	2,14	96.12
HAC 24	F	61	5800	984	677	1,45	97.60
HAC 25	M	72	9200	1117	545	2,05	97.03
HAC 27	M	36	7700	1452	901	1,61	96.84
HAC 28	F	27	7100	1477	904	1,63	97.53

Continua...

...continuação

Clínica	Sexo	Idade	Contagem Global	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Razão CD4/CD8	Pureza CD4 (%)
HAC 29	M	20	9600	676	376	1,80	96,79
HAC 30	F	53	6900	1353	907	1,49	96,27
HAC 31	F	53	6700	1223	282	4,34	98,44
HAM 01	F	55	6000	717	378	1,90	94,94
HAM 02	F	37	6500	1906	423	4,51	98,63
HAM 03	F	74	3600	1265	477	12,65	93,84
HAM 04	F	46	6200	1310	326	4,02	96,65
HAM 05	F	61	7100	2497	1001	2,49	92,36
HAM 06	F	58	2800	1221	711	1,72	98,26
HAM 07	F	56	5800	1259	393	3,20	93,77
HAM 08	M	47	8200	ND	ND	ND	98,26
HAM 09	M	64	3700	468	355	1,32	96,31
HAM 10	F	61	9200	1084	237	4,57	98,24
HAM 11	M	48	5300	2057	1864	1,10	96,49
HAM 12	F	53	10600	1760	1101	1,60	96,70
HAM 13	F	49	6800	728	556	1,31	95,70
HAM 14	F	61	6000	665	256	2,6	93,82
HAM 15	F	62	6100	919	402	2,29	96,45
HAM 16	M	55	9800	1209	721	1,68	91,29
HAM 17	F	55	8600	579	272	2,13	93,62
HAM 21	F	57	8000	876	570	1,54	97,50
HAM 22	F	48	9900	577	576	1,00	94,97
HAM 24	F	52	6200	1679	301	5,58	ND
HAM 25	M	51	5800	786	327	2,41	ND

F: feminino. M: masculino. CT: indivíduos sadios. HAC: indivíduos assintomáticos. HAM: indivíduos com HAM/TSP. ND: não determinado.

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.

3. Quantificação da CPV

As amostras dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram avaliadas por PCR quantitativa com objetivo de determinar a quantidade de provírus presentes nas células sanguíneas periféricas.

A quantificação da CPV foi realizada em 18 indivíduos assintomáticos e em 20 indivíduos que apresentam HAM/TSP, representados na Tabela 6. A média da CPV dos indivíduos assintomáticos foi 6.586 cópias/10⁵ células, enquanto para os pacientes com HAM/TSP foi 12.233 cópias/10⁵ células.

Tabela 6. Determinação da carga proviral dos indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Indivíduos infectados com HTLV-1			
Amostra	Carga Proviral (cópias/10 ⁵ células)	Amostra	Carga Proviral (cópias/10 ⁵ células)
HAC 01	1233.1	HAM 01	3007.9
HAC 03	1788.9	HAM 02	4780.8
HAC 04	68061.4	HAM 03	10654.7
HAC 05	1336.8	HAM 04	11144.8
HAC 06	667.9	HAM 05	8881.1
HAC 08	5768.5	HAM 06	1651.2
HAC 09	503.5	HAM 07	9388.3
HAC 10	152.8	HAM 08	10914.5
HAC 11	3215.6	HAM 09	9953.4
HAC 18	637.2	HAM 10	6265.5
HAC 19	1246.4	HAM 11	3599.7
HAC 20	2290.5	HAM 12	1734.1
HAC 21	7121.7	HAM 13	5230.0
HAC 24	650.7	HAM 14	116907.9
HAC 25	281.1	HAM 15	5759.9
HAC 27	6460.4	HAM 16	4739.8
HAC 28	331.6	HAM 17	864.4
HAC 31	16800.1	HAM 21	5063.7
		HAM 24	13624.6
		HAM 25	10508.2
Média	6.586	Média	12.233

HAC: indivíduos assintomáticos. HAM: indivíduos com HAM/TSP.

O teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para a análise estatística e verificou-se um aumento de 1,8 vezes no grupo HAM/TSP quando comparado com o grupo HAC ($p=0,0024$) (Figura 7).

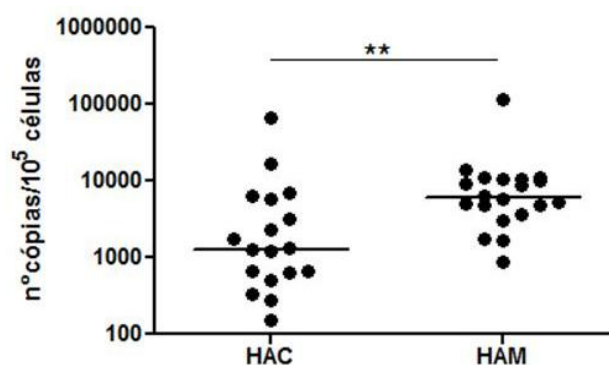


Figura 7 – Distribuição da carga proviral (nº cópias/10⁵ células) entre os indivíduos assintomáticos (HAC) e com HAM/TSP (HAM). Foi realizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney ($p=0,0024$). ** $p<0,01$

4. Quantificação da proteína Tax

A quantificação da proteína Tax intracelular foi realizada para determinar a quantidade de células T CD4⁺ e T CD8⁺ infectadas com HTLV-1. As análises foram feitas em 25 indivíduos infectados com HTLV-1, sendo 14 do grupo assintomático e 11 do grupo HAM/TSP.

Os dados obtidos pela citometria de fluxo revelaram que embora o HTLV-1 tenha predileção pelas células CD4⁺, o mesmo também infecta células CD8⁺. Entretanto, nenhuma diferença foi observada entre a porcentagem de células CD4⁺ e CD8⁺ que expressam Tax (Figura 8-A), apesar de haver um discreto aumento nas células CD4⁺. Analisando a expressão da proteína Tax nos linfócitos T CD4⁺ dos indivíduos infectados com HTLV-1, observou-se um aumento de 2,3 vezes dessa proteína nos indivíduos com HAM/TSP quando comparados com assintomáticos ($p=0,0055$) (Figura 8-B). O mesmo foi observado nas células CD8⁺, com um aumento de 2,2 vezes no grupo HAM/TSP ($p=0,0294$) (Figura 8-C). Ainda, foi verificado se existe correlação entre as expressões da proteína Tax em células CD4⁺ e em células CD8⁺. Como observado na Figura 8-D, há uma correlação positiva da expressão de Tax entre essas populações linfocitárias ($r = 0,7707$ e $p<0,0001$).

Foi analisada a correlação entre a expressão de Tax e a CPV. Para as células CD4⁺, a expressão de Tax correlacionou-se positivamente ($r = 0,7433$ e $p<0,0001$) com a CPV (Figura 8-E), porém, o mesmo não foi observado nas células CD8⁺ (dados não mostrados).

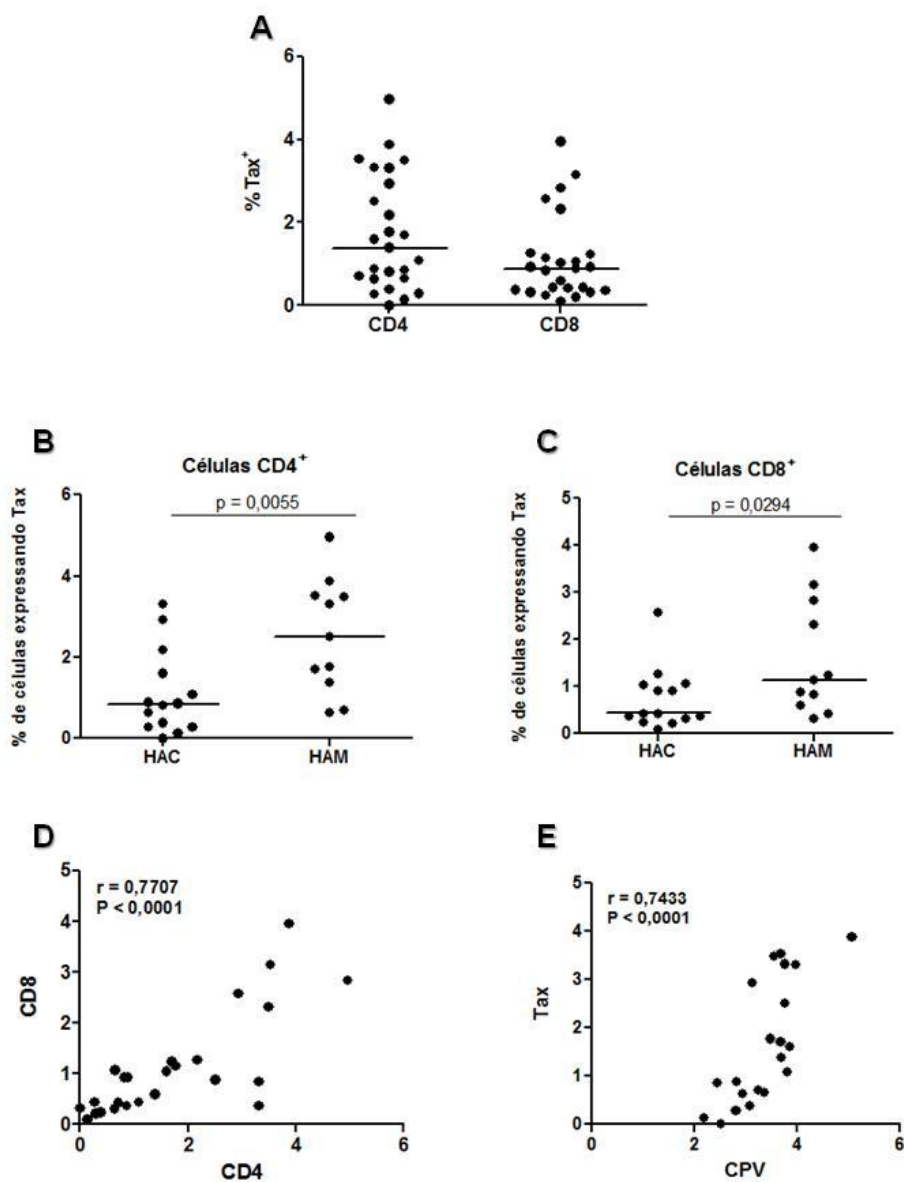


Figura 8 – Expressão da proteína Tax nas populações celulares CD4⁺ e CD8⁺. **A)** Comparação da porcentagem da expressão de Tax⁺ entre os linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. **B)** Porcentagem de células CD4⁺ positivas para a marcação intracelular de Tax. **C)** Porcentagem de células CD8⁺ positivas para a marcação intracelular de Tax. Observa-se que nas duas populações celulares, a porcentagem de células CD4⁺Tax⁺ e CD8⁺Tax⁺ é maior no grupo HAM/TSP (HAM) do que no grupo assintomático (HAC). **D)** Análise de correlação entre as expressões de Tax pelas células CD4⁺ e CD8⁺, mostrando uma correlação positiva. **E)** Correlação positiva entre a expressão de Tax e CPV.

5. Análise dos *Microarrays*

5.1 Qualidade dos *microarrays*

Para o controle dos experimentos, um relatório de qualidade das hibridizações é gerado após o escaneamento e quantificação dos *spots* presentes na lâmina. Este relatório revela o coeficiente de variação mediano obtido a partir dos sinais de fluorescência dos diferentes controles. No presente trabalho, este valor variou de 2,58% a 4,6% para todas as hibridizações (Figura 9-A). Ainda, foi obtida uma relação linear entre o sinal obtido e a concentração dos *spikes* ao longo de quatro logs em todas as hibridizações, demonstrando um alcance dinâmico (*dynamic range*) envolvendo quatro ordens de magnitude (Figura 9-B).

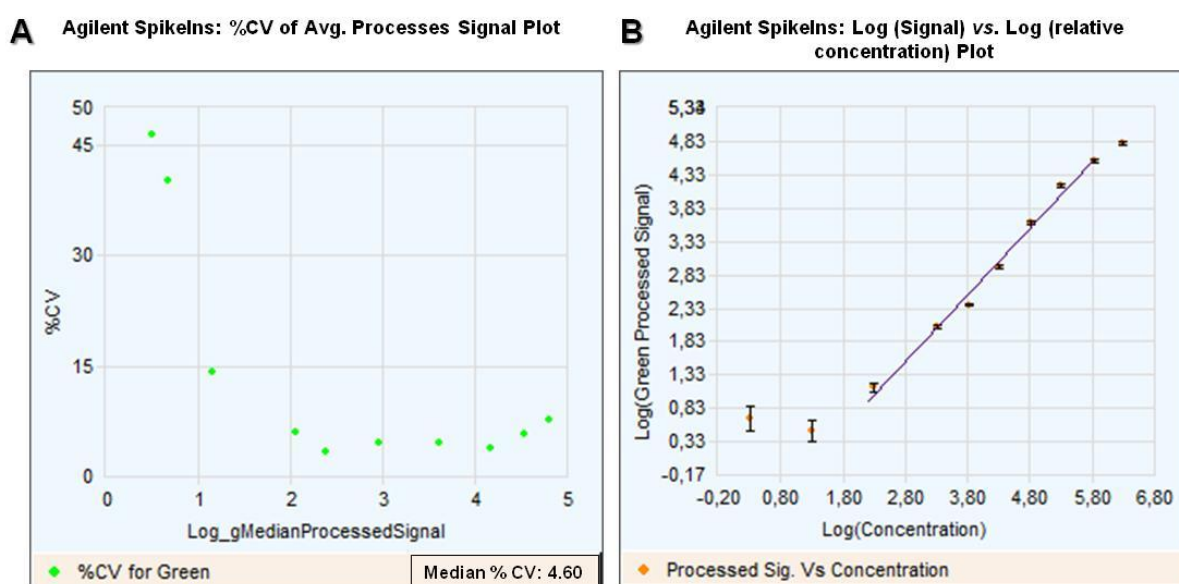


Figura 9. Demonstração da qualidade de hibridização dos controles positivos. **A)** Coeficiente de variação dos sinais de fluorescência obtidos para os diferentes controles. **B)** Relação linear entre o sinal obtido e a concentração dos *spikes*.

5.2 Agrupamento Hierárquico

As similaridades e diferenças entre o perfil de expressão gênica dos linfócitos T CD4⁺ dos indivíduos saudáveis, assintomáticos e com HAM/TSP foram analisadas através do agrupamento hierárquico. Estas análises revelaram um dendrograma com dois

agrupamentos distintos, separando os linfócitos T CD4⁺ dos CTs dos indivíduos infectados com HTLV-1 (Figura 10). Ainda, dentro do agrupamento dos indivíduos infectados com HTLV-1, houve a separação dos indivíduos assintomáticos e dos portadores de HAM/TSP. Embora as amostras fossem agrupadas de acordo com o estado clínico, as mesmas não se agruparam de acordo com alta ou baixa expressão da proteína Tax.

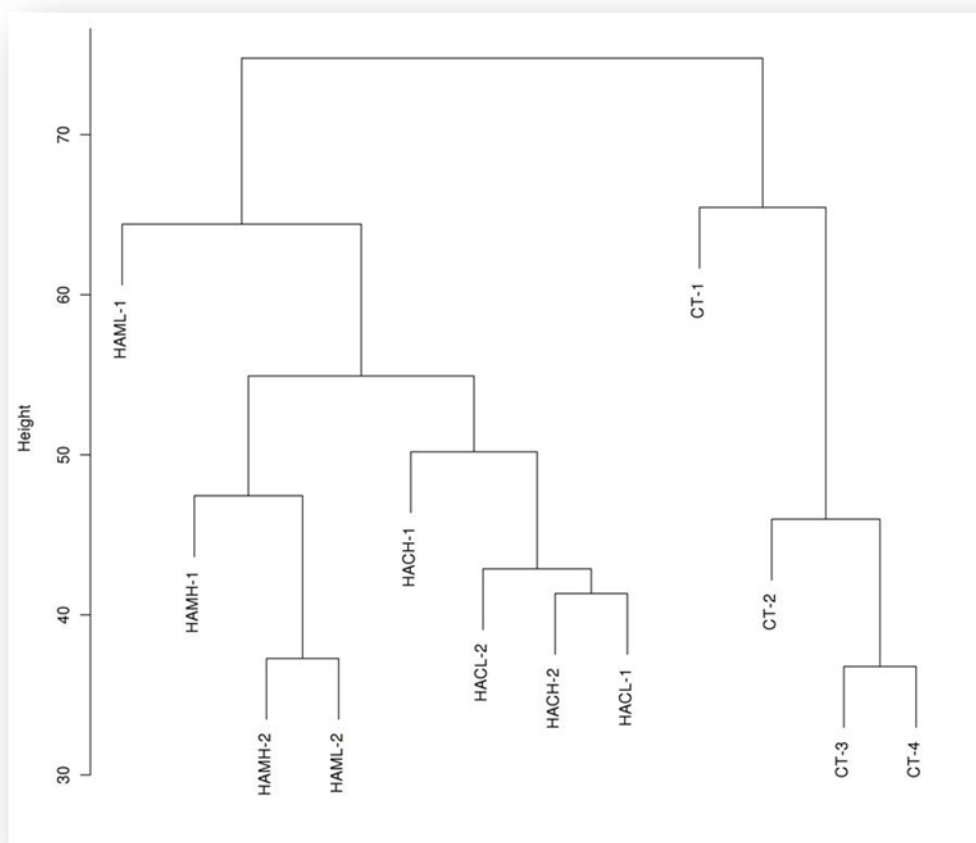


Figura 10. Análise do transcriptoma das células T CD4⁺ dos indivíduos saudáveis e infectados pelo HTLV-1. O agrupamento hierárquico foi obtido utilizando o parâmetro distância euclidiana, *average linkage*. As amostras foram agrupadas de acordo com suas similaridades. HACL-1 e HACL-2: indivíduos assintomáticos com baixa expressão de Tax. HACH-1 e HACH-2: indivíduos assintomáticos com alta expressão de Tax. HAML-1 e HAML-2: indivíduos com HAM/TSP com baixa expressão de Tax. HAMH-1 e HAMH-2: indivíduos com HAM/TSP com alta expressão de Tax.

5.3 Seleção dos genes diferencialmente expressos e caracterização quanto as funções biológicas

A análise de cada *microarray* revelou 45.015 *probes* presentes na lâmina. Após os dados serem processados, restaram 19.668 *probes* aptas para serem avaliadas. Os diferentes grupos (CT, HAC e HAM/TSP) foram comparados entre si e os genes que possuíam 2-fold e *p*

valor $< 0,005$ foram selecionados. As análises que compararam o grupo CT com o grupo HAC revelaram 221 genes diferencialmente expressos, sendo que 185 genes estavam menos expressos e 36 genes estavam mais expressos nos indivíduos assintomáticos (Figura 11). A comparação entre o grupo CT e HAM/TSP mostraram 254 genes diferencialmente expressos, dentre eles 171 genes estavam menos expressos e 83 estavam mais expressos no grupo HAM/TSP. Por fim, nas análises entre HAC e HAM/TSP foram observados 70 genes diferencialmente expressos, sendo apenas dois genes mais expressos em HAM/TSP e 68 mais expressos em HAC. As listas dos genes encontrados nas comparações CT vs. HAC, CT vs. HAM/TSP e HAM/TSP vs. HAC estão nos Apêndices A, B e C, respectivamente.

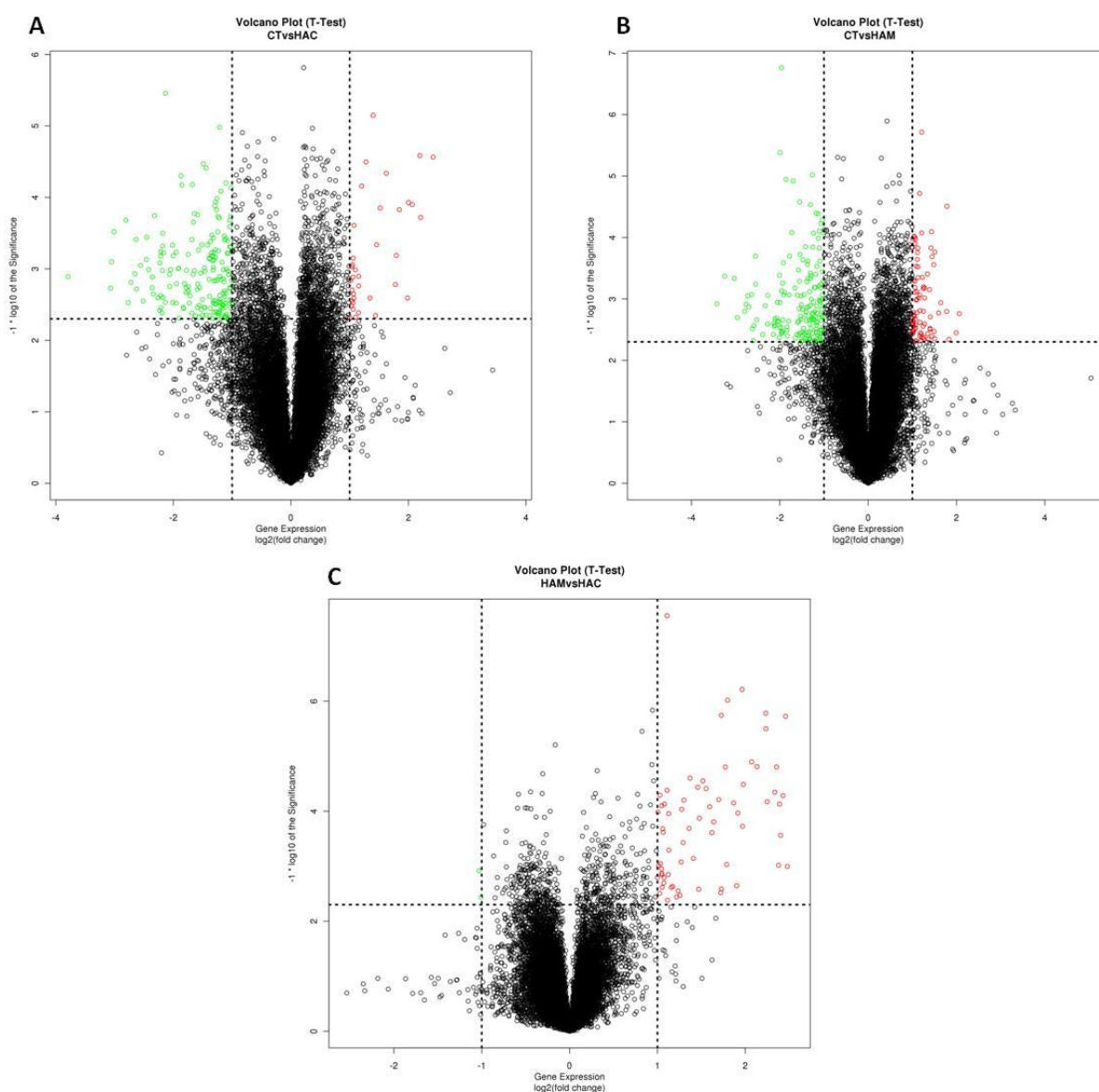


Figura 11. Comparação do padrão de expressão gênica entre os grupos CT, HAC e HAM/TSP, par a par. A barra horizontal representa a valor da expressão gênica (*fold change*) e a barra vertical a significância. Os círculos verdes significam os genes menos expressos e os vermelhos os genes mais expressos. **A)** Comparação entre CT e HAC **B)** Comparação entre CT e HAM/TSP **C)** Comparação entre HAM/TSP e HAC.

O número de genes em comum entre as três análises está demonstrado na Figura 12. Dentre eles, 86 foram observados na intersecção entre CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP. Isso significa que o grupo CT apresenta uma expressão diferenciada do grupo HAC e HAM/TSP em relação a esses genes. Na comparação entre CT vs. HAM/TSP x HAM/TSP vs. HAC, foram ressaltados 25 genes e um gene entre CT vs. HAC x HAM/TSP vs. HAC. Nenhum gene foi observado na intersecção das três análises (CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP; CT vs. HAM/TSP x HAM/TSP vs. HAC; CT vs. HAC x HAM/TSP vs. HAC). As listas dos genes encontrados nas intersecções entre CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP, CT vs. HAM/TSP x HAM/TSP vs. HAC, CT vs. HAC x HAM/TSP vs. HAC estão nos Apêndices D, E e F, respectivamente.

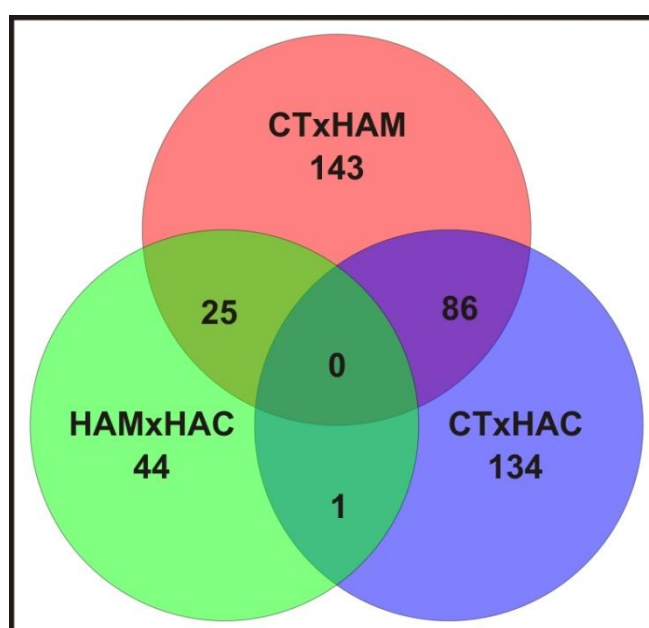


Figura 12. Diagrama de Venn. Representação do número de genes diferencialmente expressos entre as diferentes análises (CT vs. HAC; CT vs. HAM/TSP; HAM/TSP vs. HAC). O número inter gráfico representa o número de genes diferencialmente expressos em comum entre dois ou três grupos.

5.3.1 Comparação entre os grupos HAC vs. HAM/TSP

Os 70 genes diferencialmente expressos entre HAC e HAM/TSP foram analisados quanto às funções biológicas. As análises revelaram 15 funções mais representadas, dentre elas interação célula-célula, função e desenvolvimento do sistema hematológico, resposta inflamatória, resposta imunológica mediada por célula, desenvolvimento celular, hematopoiese, proliferação e crescimento celular, desenvolvimento celular, morfologia celular e tráfego das células imunológicas (Tabela 7). O gene interleucina-27 (IL-27) foi o único que teve participação em todas essas funções.

Tabela 7. Funções relacionadas com o gene IL-27, bem como as categorias nas quais estão representadas.

Categoria	Função	P valor
Morfologia celular	• polarização de células Th1	2.32E-02
Resposta imunológica mediada por células	• diferenciação de células Tr1	4.68E-03
	• geração de células Tr1	9.34E-03
	• geração de linfócitos T naïve	1.17E-02
	• desenvolvimento de células Th17	2.32E-02
	• polarização de células Th1	2.32E-02
	• diferenciação de células Th17	4.36E-02
	• diferenciação de linfócitos T naïve	4.81E-02
Interação e sinalização célula-célula	• ativação de células Th1	3.91E-02
Desenvolvimento celular	• diferenciação de células Tr1	4.68E-03
	• expansão de linfócitos T naïve	7.02E-03
	• geração de células Tr1	9.34E-03
	• geração de linfócitos T naïve	1.17E-02
	• desenvolvimento de células Th17	2.32E-02
	• polarização de células Th1	2.32E-02
	• diferenciação de células Th17	4.36E-02
	• diferenciação de linfócitos T naïve	4.81E-02
Proliferação e crescimento celular	• diferenciação de células Tr1	4.68E-03
	• geração de células Tr1	9.34E-03
	• geração de linfócitos T naïve	1.17E-02
	• desenvolvimento de células Th17	2.32E-02
	• polarização de células Th1	2.32E-02
	• diferenciação de células Th17	4.36E-02
	• diferenciação de linfócitos T naïve	4.81E-02
	• expansão de linfócitos T naïve	7.02E-03
	• proliferação de linfócitos T naïve	4.36E-02
Função e desenvolvimento do Sistema Hematológico	• diferenciação de células Tr1	4.68E-03
	• expansão de linfócitos T naïve	7.02E-03
	• geração de células Tr1	9.34E-03
	• geração de linfócitos T naïve	1.17E-02
	• desenvolvimento de células Th17	2.32E-02
	• polarização de células Th1	2.32E-02
	• ativação de células Th1	3.91E-02
	• diferenciação de células Th17	4.36E-02
	• proliferação de linfócitos T naïve	4.36E-02
• diferenciação de linfócitos T naïve	4.81E-02	
Hematopoese	• diferenciação de células Tr1	4.68E-03
	• geração de células Tr1	9.34E-03
	• geração de linfócitos T naïve	1.17E-02
	• desenvolvimento de células Th17	2.32E-02
	• polarização de células Th1	2.32E-02
	• diferenciação de células Th17	4.36E-02
• diferenciação de linfócitos T naïve	4.81E-02	
Migração das células imunes	• ativação de células Th1	3.91E-02
Resposta inflamatória	• ativação de células Th1	3.91E-02
Desenvolvimento de tecido	• geração de células Tr1	9.34E-03
	• geração de linfócitos T naïve	1.17E-02

5.3.2 Comparação entre os grupos CT vs. HAC e CT vs. HAM/TSP

Os 86 genes diferencialmente expressos entre os grupos CT vs. HAC e CT vs. HAM/TSP foram analisados com o objetivo de avaliar se os mesmos compartilhavam níveis transcricionais semelhantes. Para isso, os genes foram agrupados utilizando o *software* *Genesis* 1.75. No agrupamento observou-se que a maioria dos genes estavam mais expressos no grupo CT (Figura 13-A). Em seguida, os genes foram representados por uma *network*, na qual foi possível observar uma interação entre seis genes: PXN, CD4, PTK2B, CCL5, TNF e GH1 (Figura 13-B). Esses genes estão envolvidos principalmente em morte celular, doença inflamatória e imunológica, interação e sinalização célula-célula, movimento e manutenção da função celular. O gene PXN foi o único envolvido com a migração das células imunológicas. As vias de sinalização referentes aos 86 genes foram avaliadas e observou-se que PXN estava presente em várias, dentre elas a via do CXCR4 (Figura 13-C) responsável pela migração celular.

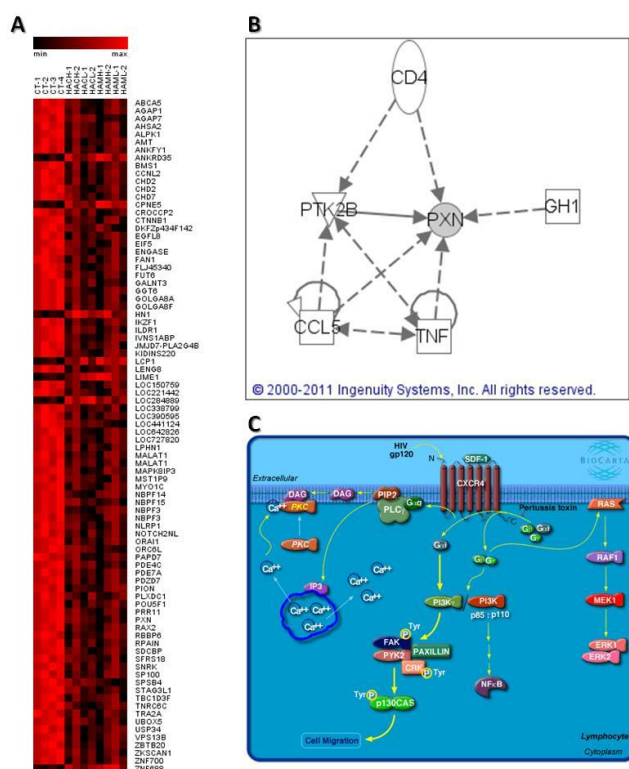


Figura 13. Análise dos genes diferencialmente expressos entre as comparações CT vs. HAC e CT vs. HAM/TSP. **A)** Agrupamento dos genes de acordo com a similaridade de expressão. O grupo CT apresenta maior nível de expressão gênica comparado com HAC e HAM/TSP. As colunas são organizadas por tipos de células e as linhas pelos genes. A coloração do *cluster* é gerada pelos valores de expressão de acordo com a chave no topo do *cluster*. Para essa análise utilizou-se a distância euclidiana – HCL – *cluster* por experimento. **B)** Análise de *networks* dos genes com expressão diferenciada entre as comparações CT vs. HAC e CT vs. HAM/TSP pelo *software* *Ingenuity Pathway Analysis*. **C)** Via do CXCR4 na qual a paxilina tem participação e ocasiona a migração celular. HAC1: indivíduo assintomático com baixa expressão de Tax. HAC2: indivíduo assintomático com alta expressão de Tax. HAM1: indivíduo com HAM/TSP com baixa expressão de Tax. HAM2: indivíduo com HAM/TSP com alta expressão de Tax.

5.3.3 Comparação entre os grupos CT vs. HAM/TSP e HAM/TSP vs. HAC

Os 25 genes diferencialmente expressos entre os grupos CT vs. HAM/TSP e HAM/TSP vs. HAC foram avaliados quanto aos níveis de expressão. Nessa análise, observou-se que os genes estavam mais expressos nos grupos CT e HAC quando comparados com o grupo HAM/TSP (Figura 14-A). Os mesmos foram analisados quanto à participação em vias de sinalização e apenas três vias foram observadas, dentre elas se destaca a via de sinalização de granzima A (GZMA) (Figura 14-B).

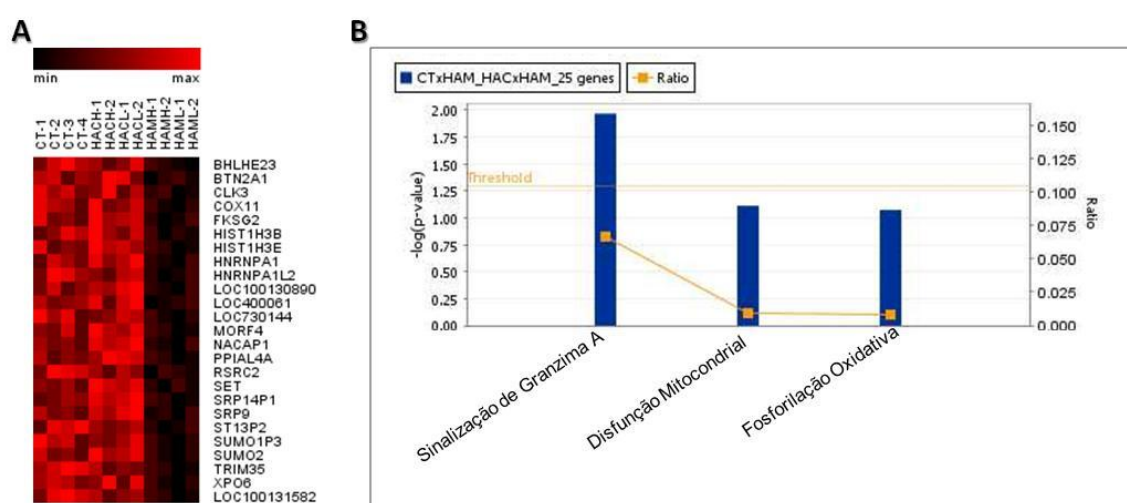


Figura 14. Análise dos genes diferencialmente expressos entre as comparações CT vs. HAM/TSP e HAM/TSP vs. HAC. **A)** Agrupamento dos genes de acordo com a similaridade de expressão. O grupo controle (CT) e assintomático (HAC) apresentam maiores níveis de expressão gênica comparados com HAM/TSP (Distância Euclidiana – HCL – Cluster por experimento). **B)** Caracterização dos genes de acordo com as vias de sinalização pelo *software Ingenuity Pathway Analysis*. HACL: indivíduo assintomático com baixa expressão de Tax. HACH: indivíduo assintomático com alta expressão de Tax. HAML: indivíduo com HAM/TSP com baixa expressão de Tax. HAMH: indivíduo com HAM/TSP com alta expressão de Tax.

Além da via de sinalização de granzima A ser a mais representada nas análises entre os grupos CT vs. HAM/TSP e HAM/TSP vs. HAC, a mesma também foi evidenciada nas análises entre os grupos HAM/TSP vs. HAC. Dentre as 15 vias de sinalização, a mesma foi a quinta via mais representada. Adicionalmente, nas análises entre os grupos CT vs. HAM/TSP, essa mesma via foi a 12° dentre as 81 vias de sinalização.

Embora o gene *GZMA* não estivesse dentro dos parâmetros de análises (*2-fold* e *p* valor 0,005), o mesmo foi selecionado para validação devido ao fato desta via de sinalização não ser muito estudada nas células T CD4⁺, mas sim nas células T CD8⁺.

6. Validação dos genes diferencialmente expressos por PCR quantitativa

Os genes IL-27 e PXN foram selecionados para o estudo de expressão gênica por PCR quantitativa utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. O critério de seleção foi baseado no valor de *2-fold change* e *p* valor menor que 0,005. Além disso, levou-se em consideração as funções biológicas associadas aos genes em questão. Dessa forma, os genes CXCR4, GZMA, GZMB, PRF1 e Foxp3 também foram validados. Como controles endógenos foram selecionados os genes ACTB, GAPDH, B2M e PRL13a.

Foi realizada a eficiência de amplificação dos genes selecionados para que o método de quantificação da expressão relativa pudesse ser aplicado. A eficiência de amplificação aceita uma variação entre 85% a 115%, entretanto, os valores referentes aos genes validados variaram de 70.66% a 108.73% (Tabela 8).

Tabela 8. Eficiência de amplificação por PCR quantitativa dos genes selecionados para validação, bem como os genes endógenos.

Gene	Slope	Eficiência
ACTB	-3.60	89.41%
GAPDH	-3.58	90.09%
B2M	-3.32	100.28%
RPL13a	-3.13	108.73%
IL-27	-3.60	89.57%
PXN	-3.49	93.51%
CXCR4	-4.10	75.24%
GZMA	-3.56	90.96%
GZMB	-4.31	70.66%
PRF1	-3.69	86.59%
Foxp3	-3.57	90.70%

Slope: inclinação da reta.

Para a validação, foram utilizadas 65 amostras, divididas em três grupos: 25 amostras do grupo CT, 23 do grupo HAC e 17 do grupo HAM/TSP.

Os genes de referência foram correlacionados para avaliar as diferenças nos valores de Cts dos mesmos. As comparações foram feitas entre *ACTB* vs. *GAPDH*, *ACTB* vs. *B2M*, *ACTB* vs. *RPL13A*, *GAPDH* vs. *B2M*, *GAPDH* vs. *RPL13A* e *B2M* vs. *RPL13A* aplicando o teste de correlação de Spearman (Figura 15). Os resultados revelaram uma

forte correlação positiva entre todas as análises e um valor de p significativo (<0.0001). Por conseguinte, para normalizar as reações de validação foi utilizada a média geométrica dos Cts desses genes para cada indivíduo (VANDESOMPELE et al., 2002). O desvio padrão das amostras de cada gene endógeno foi calculado e observou-se um desvio de 2,0 para GAPDH, 2,5 para ACTB, 1,93 para B2M e 1,71 para RPL13a.

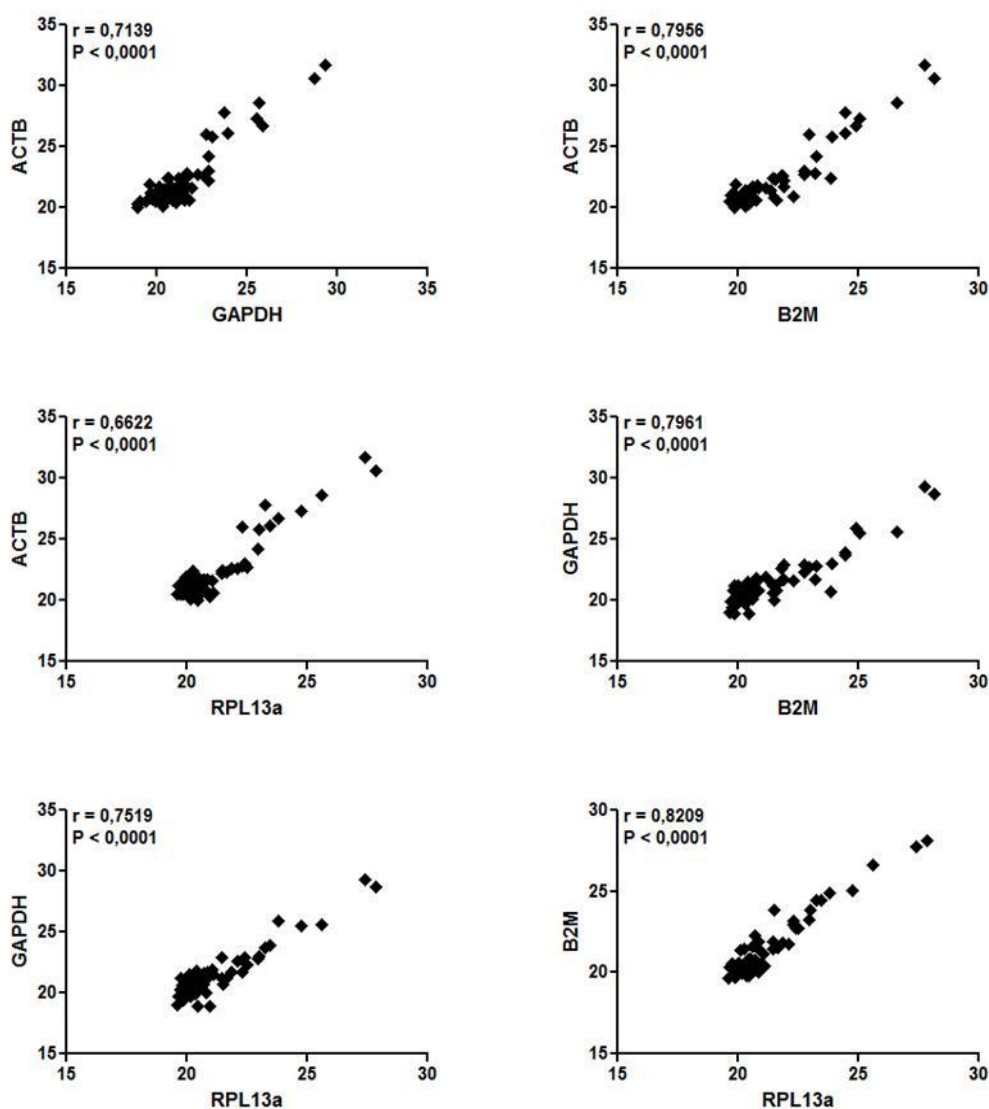


Figura 15. Correlação entre os diferentes genes endógenos: ACTB, GAPDH, B2M e RPL13a. Todas as análises revelaram uma correlação positiva e um valor de $p < 0,0001$. As análises estatísticas foram realizadas no *GraphPad Prism 5.0* utilizando o teste de correlação de Spearman.

Nas análises dos *microarrays*, dois genes (IL-27 e PXN) candidatos à validação apresentavam diferença de 2-*fold* e $p < 0,005$. Entretanto, os genes CXCR4, GZMA, GZMB e PRF1 apresentaram valores abaixo dos citados (Tabela 9). O gene Foxp3 foi validado

devido à sua função biológica, mesmo não apresentando diferença de expressão gênica significativa.

Tabela 9. Expressão obtida pela análise de *microarray* dos genes selecionados para validação. Os valores de *fold change* são referentes ao segundo grupo analisado.

Gene	<i>Fold change</i> CT vs. HAC	<i>Fold change</i> CT vs. HAM/TSP	<i>Fold change</i> HAM/TSP vs. HAC	<i>Fold change</i> CT vs. Infectado
IL-27	3.70	-1.42	5.24	1.62
PXN	-5.12	-8.17	1.60	-6.47
GZMA	-1.00	1.86	-1.87	1.36
GZMB	-1.78	-2.12	1.19	-1.94
PRF1	-1.04	1.58	-1.65	1.23
CXCR4	-1.46	-1.48	1.01	-1.47

Após a realização da PCR quantitativa, a expressão do gene IL-27 corroborou com os dados dos *microarrays*, mostrando diferenças na expressão entre os grupos CT vs. HAC ($p=0,0002$) e HAC vs. HAM/TSP ($p=0,0392$). Na figura 16, podem ser observados os gráficos de dispersão de todos os genes validados, bem como os p valores.

Interessantemente, no método de *microarray* a PXN que tinha sua expressão aumentada 5.12 e 8.17 vezes no grupo CT comparado com o grupo HAC e HAM/TSP respectivamente, apresentou menor expressão no grupo controle quando comparado com HAC e HAM/TSP por PCR quantitativa. Embora nenhuma diferença significativa fosse observada na comparação entre CT vs. HAC é possível observar um discreto aumento no grupo HAC (Figura 16-B). Entretanto, PXN estava 1,5 vezes mais expresso em HAM/TSP comparado com CT ($p=0,0002$) e 1,3 vezes mais expressos em HAM/TSP em relação à HAC ($p=0,0059$).

Os genes PRF1 e GZMA, revelados pelo *microarray*, foram confirmados na validação. Ambos se apresentaram mais expressos no grupo HAM/TSP (Figura 16-C e E) quando comparados com o grupo CT ($p<0,0001$ e $p=0,0038$, respectivamente) e também quando comparados com o grupo HAC ($p=0,0037$ e $p=0,0071$, respectivamente). Ainda o gene PRF1 estava 1,5 vezes mais expresso no grupo HAC em relação ao grupo CT ($p=0,0168$). Nenhuma diferença foi observada na expressão de GZMB (Figura 16-D).

Embora nas análises dos *microarrays* o gene CXCR4 não apresentasse diferenças de expressão entre os grupos HAC e HAM/TSP; na validação o mesmo estava 1,4 vezes mais expresso no grupo HAM/TSP ($p=0,0305$) (Figura 16-F).

Na análise da expressão do Foxp3 notou-se uma superexpressão no grupo HAM/TSP comparado com o grupo CT e HAC ($p=0,0003$ e $p=0,0016$, respectivamente).

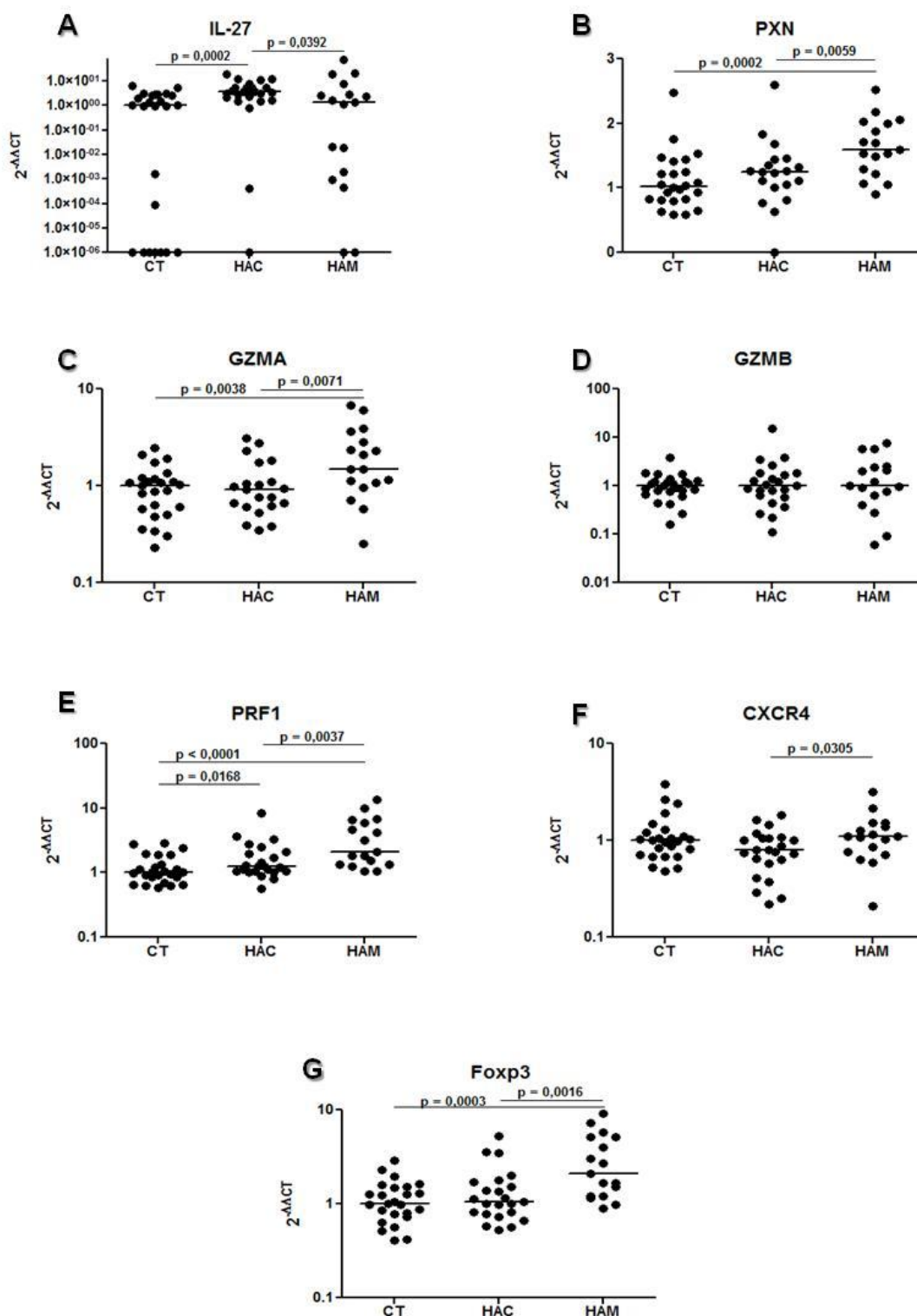


Figura 16. Validação dos genes IL-27 (A), PXN (B), GZMA (C), GZMB (D), PRF1 (E), CXCR4 (F) e Foxp3 (G) por meio da quantificação relativa por PCR quantitativa. Cada ponto exibido no gráfico representa um indivíduo que pode pertencer ao grupo controle (CT), assintomático (HAC) e com HAM/TSP (HAM). Os valores da expressão relativa foram obtidos a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney unicaudal.

Quando foram comparados os níveis de expressão de todos os genes entre o grupo CT e o grupo infectado (HAC + HAM/TSP), foi observada uma expressão diferencial significativa nos genes IL-27 ($p=0,0019$), PRF1 ($p=0,0003$) PXN ($p=0,0022$) e Foxp3 ($p=0,0128$), com maiores níveis de expressão no grupo de indivíduos infectados (Figura 17).

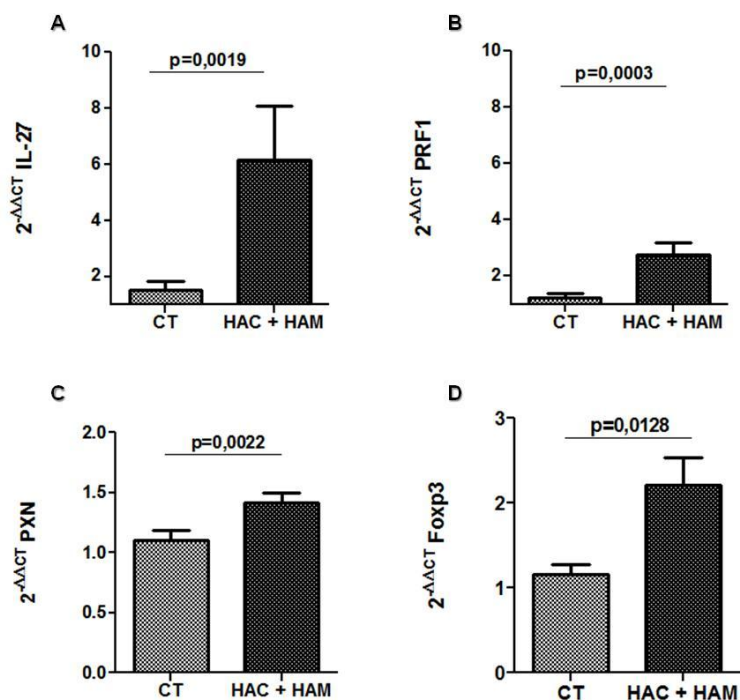


Figura 17. Expressão gênica dos genes IL-27 (A), PRF1 (B), PXN (C), e Foxp3 (D) determinada por PCR quantitativa. Nos gráficos pode-se observar a expressão dos genes relacionados aos grupos controle (CT) e infectados (HAC+HAM/TSP). As barras representam os valores da expressão relativa obtidos a partir do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ com o desvio-padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney unicaudal.

7. Análise da relação de Tax e CPV com os genes selecionados para validação

Foi avaliado se existe alguma correlação entre as expressões de Tax em células T CD4⁺ e a expressão dos genes selecionados para validação, bem como a correlação da CPV com os mesmos. Para estas análises, aplicou-se o teste de correlação de Spearman (Figura 18). Os únicos genes que apresentaram correlação positiva com a expressão de Tax foram PRF1 e Foxp3 ($r=0,3789$ e $p=0,0497$, $r=0,6752$ e $p=0,0005$, respectivamente). Os mesmos resultados foram obtidos nas análises com a CPV, os genes PRF1 e Foxp3 apresentaram correlação positiva com a CPV ($r=0,3752$ e $p=0,0144$, $r=0,5566$ e $p=0,0003$, respectivamente).

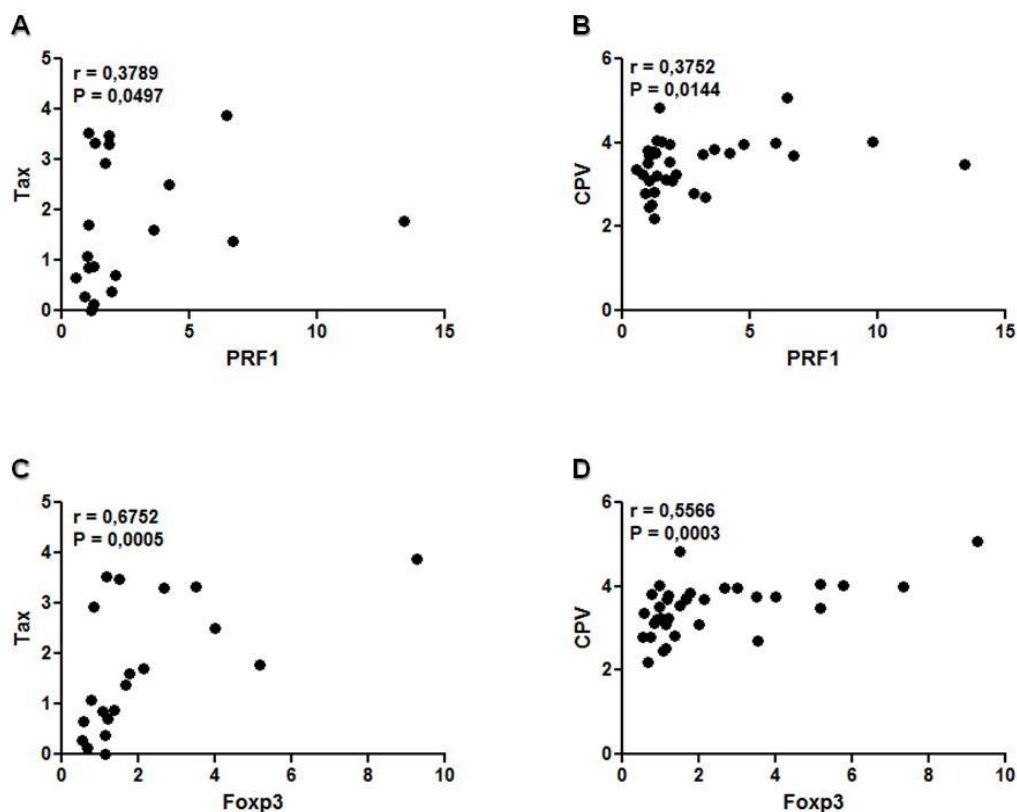


Figura 18. Correlação entre a expressão dos genes PRF1 e Foxp3 com Tax e CPV. **A/C)** Correlação entre a expressão de Tax e PRF1 (A) e Foxp3 (C) **B/D)** Correlação entre CPV e a expressão de PRF1 (B) e Foxp3 (D) As análises revelaram uma correlação positiva e um valor de p significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de correlação de Spearman.

8. Quantificação da expressão de CXCR4

A expressão da proteína CXCR4 foi quantificada por citometria de fluxo e nessas análises foram incluídos 23 indivíduos do grupo CT e 16 indivíduos em cada um dos grupos HAC e HAM/TSP. Para a realização desta técnica, as células T CD4⁺ foram marcadas com os anticorpos anti-CD4, anti-CD3 e anti-CXCR4.

Nenhuma diferença estatística significativa foi observada na intensidade média de fluorescência (IMF) para a marcação de CXCR4 entre os diferentes grupos (Figura 19-A). Entretanto, é possível observar que os níveis de expressão do CXCR4 nos indivíduos HAM/TSP encontram-se discretamente aumentados quando comparados com os grupos CT e HAC. Ainda, quando foram comparados os grupos dos indivíduos saudáveis com os indivíduos infectados pelo HTLV-1 nenhuma diferença foi encontrada (Figura 19-B).

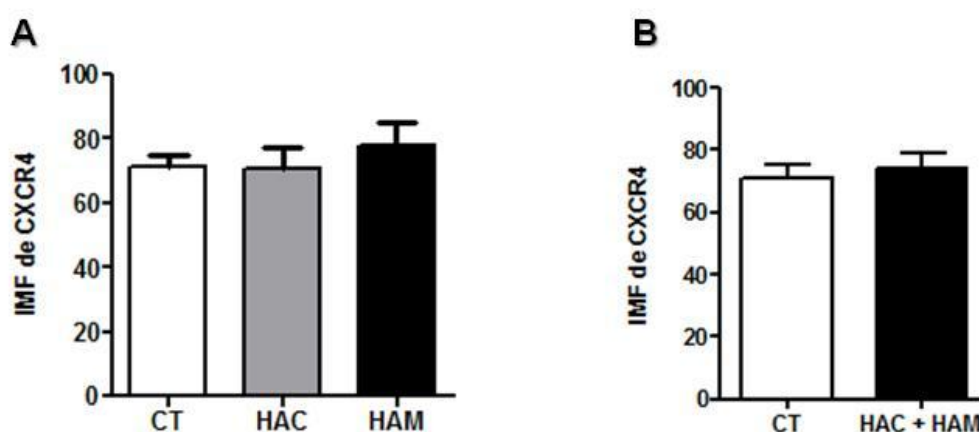


Figura 19. Intensidade média de fluorescência (IMF) de células CD4⁺ positivas para CXCR4. **A)** Comparação das IMF de células CD4⁺ positivas para CXCR4 entre os diferentes grupos: controle (CT), assintomático (HAC) e HAM/TSP (HAM). **B)** Comparação entre IMF de células CD4⁺ positivas para CXCR4 entre o grupo de indivíduos saudáveis e indivíduos infectados pelo HTLV-1. As barras representam a média de IMF com o desvio-padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney unicaudal.

9. Quantificação da expressão de Perforina 1 e Granzima B

A quantificação da expressão de perforina 1 (PRF1) e granzima B (GZMB) foi realizada por meio de citometria de fluxo. Para essas análises, foram utilizadas 14 amostras de cada grupo (CT, HAC e HAM/TSP). As porcentagens e IMF das células CD4⁺ positivas para PRF1 e GZMB não mostraram diferenças significativas entre os três grupos comparados, conforme observado na Figura 20. Ainda, nenhuma diferença significativa foi observada nas comparações entre os indivíduos saudáveis e infectados (dados não mostrados).

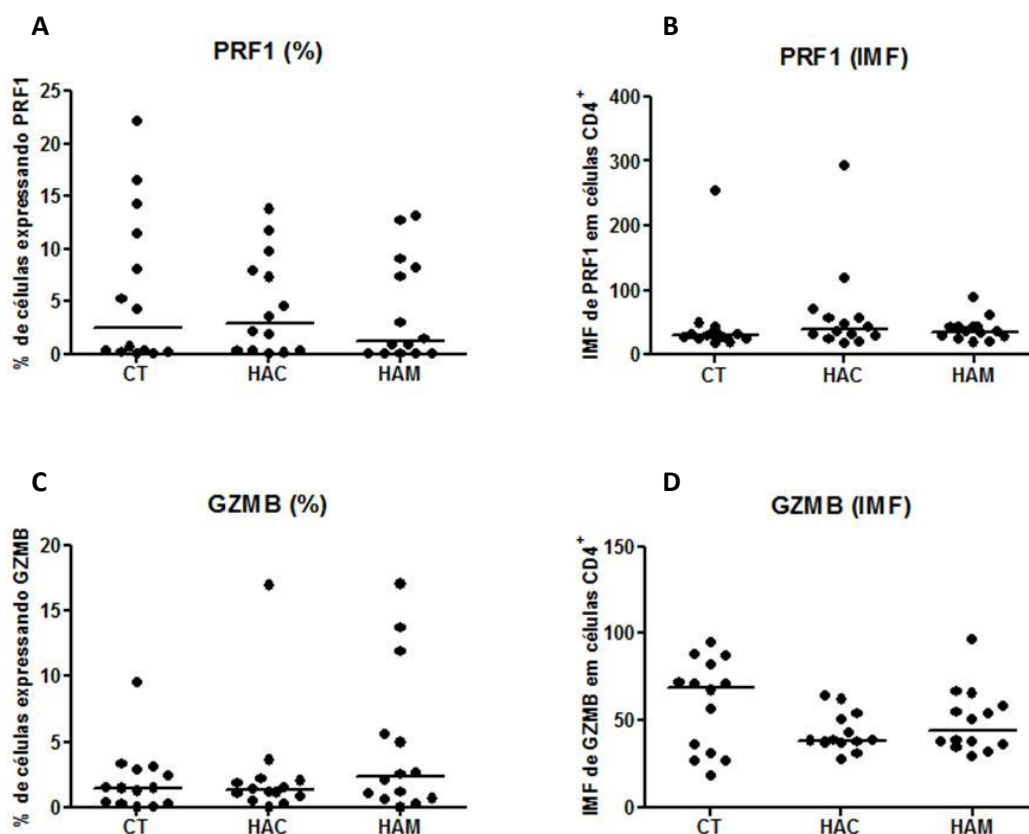


Figura 20. Frequência e intensidade média de fluorescência (IMF) das células $CD4^+$ positivas para PRF1 e GZMB. **A/C)** Frequência de células $CD4^+$ positivas para PRF1 (A) e GZMB (C) nos grupos controle (CT), assintomático (HAC) e HAM/TSP (HAM). **B/D)** Comparação da IMF de células $CD4^+$ positivas para PRF1 (B) e GZMB (D) nos grupos estudados. As barras representam a IMF com o desvio-padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney unicaudal.

10. Quantificação da expressão de Foxp3

A expressão da proteína Foxp3 foi quantificada por citometria de fluxo. Nessas análises, foram avaliados 13 indivíduos do grupo CT, 10 indivíduos do grupo HAC e 12 do grupo HAM/TSP.

Nenhuma diferença estatística significativa foi observada na quantidade de células $CD3^+CD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$ entre os três grupos distintos, bem como entre os indivíduos sadios e infectados (Figura 21 – A e B). Entretanto, nas análises das células $CD4^+Foxp3^+$ observou-se um aumento de 8,2 vezes no grupo HAC comparado com o grupo CT ($p=0.0016$) e também um aumento 3,3 vezes no grupo HAM/TSP comparado com o grupo CT ($p=0,0128$) (Figura 21 – C). Ainda, na comparação entre os indivíduos sadios e

infectados (HAC + HAM/TSP), foi encontrado um maior nível de expressão nos indivíduos infectados ($p=0,0012$) (Figura 21 – D).

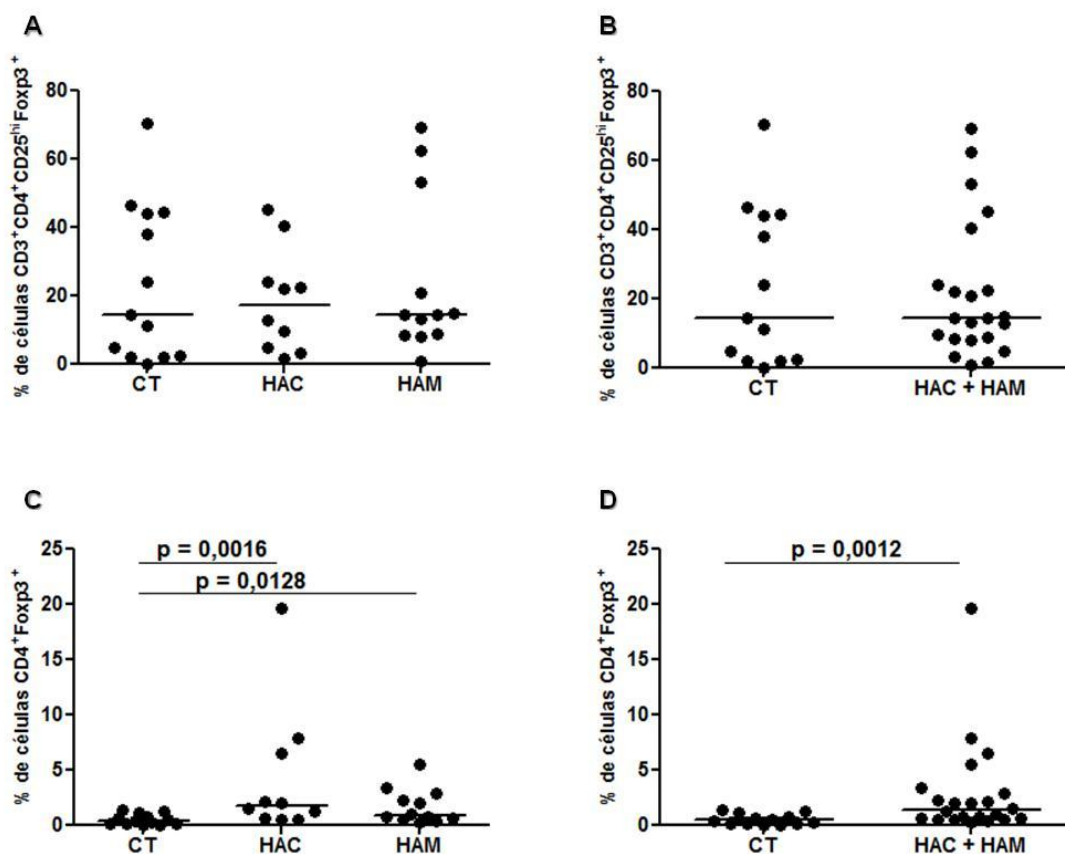


Figura 21. Frequência das células CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺ e CD4⁺Foxp3⁺. **A)** Frequência de células CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} positivas para Foxp3 nos grupos controle (CT), assintomático (HAC) e HAM/TSP (HAM). **B)** Comparação da frequência de células CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} positivas para Foxp3 entre o grupo CT e infectado. **C)** Frequência de células CD4⁺ positivas para Foxp3 nos grupos CT, HAC e HAM. **D)** Comparação da frequência de células CD4⁺ positivas para Foxp3 entre o grupo CT e infectado. As análises estatísticas foram realizadas no *GraphPad Prism 5.0* utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney unicaudal.

Discussão



V. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi comparado o perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4⁺ isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis e infectados pelo HTLV-1 pela metodologia de *microarray*. A escolha das células T CD4⁺ para esta avaliação justifica-se por serem o principal reservatório do HTLV-1 *in vivo* (RICHARDSON et al., 1990; HANON et al., 2000), participarem da resposta imunológica contra o HTLV-1 auxiliando não só na resposta dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs), mas também na produção de anticorpos. Para tanto, os indivíduos infectados foram divididos em dois grupos de acordo com o estado clínico em assintomáticos (HAC) e HAM/TSP.

Na caracterização dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 incluídos neste estudo observou-se que 57,7% e 76,2% eram do sexo feminino no grupo HAC e HAM/TSP, respectivamente. Esses dados corroboram com a literatura, pois a infecção pelo HTLV-1 apresenta maior prevalência no sexo feminino (MANNING & BLATTNER, 1991; CATALAN-SOARES et al., 2001) uma vez que existe uma maior eficácia na transmissão sexual homem-mulher do que o inverso (KAPLAN et al., 1996). Ainda, pesquisas apontam o sexo feminino como um fator associado ao desenvolvimento de HAM/TSP (LIMA et al., 2005). Os indivíduos pertencentes ao grupo HAC (42,9 anos) apresentaram uma média de idade inferior quando comparado aos indivíduos do grupo HAM/TSP (54,9 anos). De acordo com Catalan-Soares et al. (2001), a prevalência aumenta com a idade e isso acontece devido à latência da infecção inicial e a reativação ao longo da vida ou a um aumento progressivo no título de anticorpos nas pessoas infectadas com o decorrer do tempo.

A quantificação da CPV no grupo HAM/TSP foi 1,8 vezes mais elevada em relação ao grupo HAC. A média da CPV dos indivíduos HAC e HAM/TSP foi 6.586 e 12.233 (cópias/10⁵ células), respectivamente. A literatura demonstra que a CPV em indivíduos HAM/TSP é superior quando comparados aos portadores assintomáticos (MONTANHEIRO et al., 2005). Muitos estudos descrevem que a CPV elevada está associada com progressão para HAM/TSP (HASHIMOTO et al., 1998; MONTANHEIRO et al., 2005; NAGAI et al., 1998). Embora a detecção da CPV no sangue periférico esteja associada com HAM/TSP, este não é o único parâmetro para o prognóstico ou diagnóstico desta patologia (NAGAI et al., 1998; MATSUZAKI et al., 2001).

Neste estudo, a proteína viral Tax intracelular foi quantificada pelo método de citometria de fluxo (ASQUITH et al., 2005) para determinar o número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ infectadas pelo HTLV-1. Os resultados demonstram que ambas as células são infectadas pelo HTLV-1, e embora esse retrovírus tenha preferência pelas células T CD4⁺, não foi observado nenhum aumento significativo da proteína viral Tax nessas células

quando comparadas com as células T CD8⁺. A expressão da proteína Tax em células CD4⁺ correlacionou-se positivamente com a expressão de Tax em células CD8⁺. O estudo realizado por Nagai et al. (2001) demonstrou que, assim como as células CD4⁺, as células CD8⁺ também são infectadas pelo HTLV-1. O mesmo estudo relatou a correlação positiva entre a quantidade de células CD4⁺ e CD8⁺ infectadas pelo vírus, resultados esses que corroboram com os encontrados neste trabalho. A frequência de células CD4⁺Tax⁺ e CD8⁺Tax⁺ foi maior nos indivíduos do grupo HAM/TSP quando comparados com os indivíduos do grupo HAC. Esses achados estão de acordo com a literatura, na qual a frequência das células T CD4⁺ HTLV-1-específica parece ser significativamente maior em indivíduos com HAM/TSP comparado com os indivíduos HAC com a mesma carga proviral. Essa observação evidencia que as células T CD4⁺ contribuem para a patogênese da doença inflamatória (GOON et al., 2002; GOON et al., 2004).

No estudo de Asquith et al. (2005) foi relatado que a carga proviral e a proporção de células T CD4⁺Tax⁺ estavam fortemente correlacionadas positivamente. Em concordância, no presente trabalho, somente a expressão de Tax pelas células CD4⁺ mostrou correlação positiva com a CPV.

No intuito de analisar se indivíduos infectados pelo HTLV-1 com níveis de expressão de Tax semelhantes possuem o mesmo perfil de expressão gênica nas células T CD4⁺, realizou-se a técnica de *microarray*. Este método foi descrito em meados da década de 90 para quantificar a expressão gênica em larga escala, permitindo medir o nível de expressão de milhares de genes simultaneamente (SCHENA et al., 1995; SHALON et al., 1996). A metodologia é baseada na propriedade de hibridização por complementariedade dos ácidos nucleicos. Na lâmina de *microarray*, estão depositadas as sondas que apresentam sequências similares às dos genes de interesse, e complementares às sequências do RNA mensageiro (RNAm). Esta configuração permite medir e avaliar o perfil de expressão gênica em diferentes tipos celulares e tecidos biológicos com o objetivo de entender os mecanismos de transformação molecular entre essas condições biológicas, como por exemplo, tecidos sadios ou patológicos. Várias técnicas experimentais já foram desenvolvidas com a finalidade de medir níveis de expressão gênica, tais como *Northern blotting* e PCR quantitativa. Entretanto, esses métodos apresentam a desvantagem de analisar um número limitado de genes. Outras técnicas como *Serial Analysis of Gene expression* (SAGE) e *microarray* foram desenvolvidas para analisar a expressão gênica em larga escala, permitindo avaliar o nível de expressão de milhares de transcritos.

Foram realizados *microarrays* de 12 amostras individuais: quatro amostras de indivíduos sadios (CT), quatro amostras de indivíduos HAC e quatro amostras de pacientes com HAM/TSP (os dois últimos grupos contêm duas amostras com alta e duas com baixa expressão de Tax). As análises de agrupamento hierárquico revelaram que o perfil de

expressão gênica dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 difere dos indivíduos do grupo CT pela formação de dois agrupamentos distintos. Ademais, os indivíduos infectados pelo HTLV-1 se agruparam de acordo com o estado clínico e independente da expressão de Tax. Contrariamente, o estudo de Vine et al. (2004) analisou o perfil de expressão gênica nas células T CD4⁺ infectadas com HTLV-1 com alta e baixa carga proviral, por meio da metodologia de *microarray* e não encontrou diferenças de expressão entre os grupos HAC e HAM/TSP. Essa diferença nos resultados entre ambos os trabalhos pode ser explicada pelo fato da técnica de *microarray* do estudo mencionado ter sido realizado com um *pool* de amostras, ao contrário do presente estudo que realizou o mesmo experimento com amostras individuais. Por outro lado, Oliére et al. (2010) mostraram que o perfil de expressão gênica global de linfócitos T CD4⁺ de indivíduos saudáveis, HAC, HAM/TSP e ATL são incorporados em três agrupamentos distintos, no qual HAC e HAM/TSP estão no mesmo agrupamento.

A análise das amostras de linfócitos T CD4⁺ revelou um total de 45.015 *probes* presentes na lâmina. Foram realizadas as comparações entre os grupos CT vs. HAC, CT vs. HAM/TSP e HAM/TSP vs. HAC e os dados revelaram a presença de 221, 254 e 70 genes diferencialmente expressos, respectivamente. Além disso, foram analisados 86 genes presentes nas intersecções entre CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP, 25 genes entre CT vs. HAM/TSP x HAM/TSP vs. HAC e apenas um gene entre CT vs. HAC x CT vs. HAM/TSP. Os genes diferencialmente expressos foram analisados quanto às funções biológicas e alguns genes foram associados à lise celular, migração celular e citocinas.

1. Genes associados à citocinas

As análises dos *microarrays* revelaram que a expressão do gene IL-27 encontrava-se significativamente aumentada, aproximadamente três e cinco vezes, nos indivíduos do grupo HAC em relação ao grupo CT e HAM/TSP, respectivamente. A avaliação dos níveis de expressão deste gene por PCR quantitativa validou os resultados obtidos.

A IL-27 é uma citocina heterodímera, membro da família IL-12, composta pelas subunidades p28 e Ebi3 (*Epstein-Barr-induced gene 3*) (PFLANZ et al., 2002). Está frequentemente presente em sítios inflamatórios e pode promover resposta anti e pró-inflamatória dependendo do contexto celular (VILLARINO et al., 2004). Inicialmente, a IL-27 foi caracterizada como uma citocina pró-inflamatória por induzir a diferenciação de Th1 (PFLANZ et al., 2002). Entretanto, com o passar do tempo foi descrito que IL-27 suprime a

diferenciação das subpopulações Th1, Th2 e Th17, demonstrando o seu papel anti-inflamatório (NIEDBALA et al., 2008; BATTEN et al., 2006, YOSHIMURA et al., 2006). Portanto, IL-27 parece ter duas funções distintas: um como iniciador da resposta imunológica e outro como atenuador da resposta imune/inflamatória.

Estudos anteriores relatam que IL-27 inibe a replicação do HIV-1 nas células T CD4⁺ e macrófagos (FAKURUDDIN et al., 2007; IMAMICHI et al., 2008; GREENWELL-WILD et al., 2009). Frank et al. (2010) demonstraram o papel da IL-27 na inibição da replicação do HCV. Esses dados sugerem que IL-27 exerce a função antiviral contra o HIV-1 e HCV. Há somente um trabalho na literatura que descreve o papel da IL-27 na infecção pelo HTLV-1, entretanto, o mesmo foi realizado em pacientes com ATLL (LARO USSERIE et al., 2005). O estudo analisa a expressão das duas subunidades de IL-27 e descrevem que Ebi3 está superexpressa nas células ATLL podendo exercer assim um efeito anti-viral ou anti-tumoral.

Neste trabalho demonstramos a expressão diferencial do gene IL-27 em indivíduos HAC e HAMTSP. O fato da IL-27 estar aumentada no grupo HAC sugere que esta citocina possa estar exercendo um papel anti-inflamatório, impedindo assim que o indivíduo infectado pelo HTLV-1 desenvolva HAM/TSP. Entretanto, embora a IL-27 possa inibir a replicação viral, não houve correlação entre IL-27 e CPV.

A IL-27 tem ganhado considerável atenção em termos de aplicação terapêutica para doenças autoimunes. Wang et al. (2008) demonstraram que células estromais da medula óssea derivada da IL-27 tem um efeito supressor no desenvolvimento doença encefalomielite autoimune experimental (EAE). Similarmente, Amadi-Obi et al. (2007) relataram a supressão da uveoretinite autoimune experimental (EAU) pela administração da IL-27. Portanto, a IL-27 pode ter potencial terapêutico em doenças autoimunes como esclerose múltipla ou uveítes. Nesse sentido, a IL-27 poderia ser uma opção terapêutica em indivíduos infectados pelo HTLV-1 com o objetivo de suprimir a inflamação causada pelo retrovírus e conseqüentemente diminuir o risco de desenvolvimento de HAM/TSP. Entretanto, se faz necessário a utilização de ensaios clínicos para melhor caracterizar o papel da IL-27 na infecção pelo HTLV-1.

2. Genes associados à migração celular

Dos genes validados, dois estão envolvidos com migração celular: CXCR4 e PXN.

O CXCR4 é um receptor de quimiocinas essencial em diversos mecanismos, como no *homing* de progenitores hematopoéticos, interação vírus-hospedeiro e na

mobilização de células para sítios de inflamação. Ainda, CXCR4 é o principal co-receptor para a entrada do HIV na célula hospedeira (FENG et al., 1996). Nos indivíduos infectados pelo HIV, a expressão da proteína CXCR4 encontra-se diminuída. Isso pode ser explicado, pois após a sua ligação direta com o vírus na superfície celular, o receptor é internalizado (CHOI et al., 2008). Os níveis de expressão do CXCR4 também foram encontrados reduzidos em outras infecções virais, tais como Herpesvírus Humano 6 (HHV-6) e Herpesvírus Humano 7 (HHV-7) (YASUKAWA et al., 1999).

O CXCR4 é amplamente expresso em células do sistema imunológico e do sistema nervoso central (MOEPPS et al., 1997; JAZIN et al., 1997) e uma vez integrado ao seu ligante SDF-1 (*stromal cell-derived factor 1*), pode mediar a migração de leucócitos em repouso e de células progenitoras hematopoéticas (BLEUL et al., 1996; AIUTI et al., 1997). Estudos demonstraram que SDF-1 após se ligar ao seu receptor CXCR4 ocasiona mobilização do cálcio e ativação de várias vias de sinalização incluindo PI-3 (fosfatidilinositol-3) quinase, ERK (quinase extracelular ativada pelo receptor) e MAPK (quinases protéica ativadas por mitógenos) (GANJU et al., 1998; SOTSIOS et al., 1999; VICENTE-MANZANARES et al., 1999; GUINAMARD et al., 1999). A estimulação de SDF-1 aumenta a fosforilação da tirosina em múltiplos componentes de adesão focal, incluindo p130Cas, CrkII e paxilina. Dessa forma, a SDF-1 requer da via de sinalização PI-3 cinase para induzir a fosforilação desses componentes de adesão focal bem como na migração de células (DUTT et al., 1998; WANG et al., 2000).

A PXN foi identificada como uma proteína de adesão focal de 68 kDa (TURNER et al., 1990). Esta proteína está envolvida com a transdução de sinais, rearranjo do citoesqueleto e nos mecanismos de adesão e migração celular (revisado por TURNER, 1998). A migração de células pode ocorrer por vários mecanismos e um deles é através da via de sinalização de CXCR4, na qual a PXN se encontra nas últimas etapas da ativação.

Não há relatos na literatura que descrevem a função de PXN na infecção pelo HTLV-1. Entretanto, há alguns trabalhos que analisam o papel do CXCR4. Arai et al. (1998) demonstraram que o transativador viral Tax induz a expressão do ligante SDF-1. Além disso, a expressão de Tax correlaciona-se com a interação SDF-1/CXCR4 nos linfócitos T transformados que expressam Tax (TWIZERE et al., 2007). Foi relatado também que algumas citocinas inflamatórias estão com a expressão aumentada na infecção pelo HTLV-1 tais como TNF- α e INF- γ (KUBOTA et al., 1998) e modulam negativamente a expressão de CXCR4 (GUPTA et al., 1998).

O gene PXN foi selecionado para validação devido ao fato de estar superexpresso nos indivíduos do grupo controle quando comparados com os indivíduos dos grupos HAC e HAM/TSP. Curiosamente, quando este gene foi validado, ao contrário das análises de *microarrays*, observou-se um aumento significativo no grupo infectado pelo

HTLV-1 (HAC + HAM/TSP). Ademais, o gene CXCR4, embora não apresentasse diferenças significativas nos *microarrays*, foi selecionado para validação pelo fato de participar da mesma via que a PXN. A expressão do CXCR4 era concordante com a PXN na técnica de *microarray*, estando mais expresso no grupo controle comparado com o grupo HAC e HAM/TSP. Entretanto, na validação do CXCR4 notou-se um aumento significativo de sua expressão no grupo HAM/TSP comparado com o grupo HAC. Nenhuma diferença foi observada na quantificação dos níveis protéicos de CXCR4 por citometria de fluxo. Esses achados discordam do estudo de Arai et al. (1998) que demonstram, por meio da metodologia de citometria de fluxo, que os níveis de expressão do CXCR4 foram menores nas linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1 quando comparada com as linhagens negativas para o vírus. Essa discordância encontrada entre os trabalhos pode ser explicada pelo fato do autor utilizar linhagens infectadas pelo HTLV-1, enquanto no presente estudo, foram utilizadas células de indivíduos infectados pelo mesmo retrovírus com diferentes sinais clínicos.

As discrepâncias entre os resultados obtidos pelas técnicas de *microarray* e PCR quantitativa são difíceis de explicar, entretanto isso pode ocorrer devido à hibridização inespecífica e/ou hibridização cruzada. Ambas as técnicas, PCR quantitativa e *microarray*, têm a vantagem da velocidade e do alto grau de automação potencial quando comparadas a métodos tradicionais de quantificação, como por exemplo, as análises de *Northern blot* e hibridização *in situ*. A PCR quantitativa é um dos mais sensíveis e confiáveis métodos para análise de expressão gênica e tem sido largamente utilizada como validação de experimentos de *microarrays*. Embora a técnica de *microarray* possua capacidade de analisar numerosos transcritos, a qualidade dos dados de expressão gênica nesse tipo de método pode variar muito dependendo da plataforma e do procedimento utilizado. No entanto, a sua capacidade de relatar com precisão as alterações na expressão gênica tem sido amplamente discutida (TAN et al., 2003; YAUK et al., 2004; ZHU et al., 2005). Dessa forma, se faz necessário a utilização da PCR quantitativa como ferramenta de validação para confirmar os resultados de expressão obtidos pela técnica de *microarray* (MOREY et al., 2006).

Um trabalho realizado por Kawaguchi et al. (2009) demonstrou que as células linfomatosas derivada de pacientes com ATLL expressam CXCR4 e exibem atividade quimiotática em resposta a SDF-1. Neste mesmo trabalho, os autores utilizaram um antagonista do CXCR4 (AMD3100) e observaram uma diminuição na migração das células. Portanto, esses resultados mostram o envolvimento da interação CXCR4/SDF-1 como um mecanismo de migração das células leucêmicas e dessa forma pode ser um novo alvo para terapia de ATLL.

Conforme já descrito no presente trabalho, os linfócitos infectados pelo HTLV-1 podem atravessar a barreira hemato-encefálica e na tentativa de combater a infecção causam uma resposta imunológica intensa ocasionando o desenvolvimento de HAM/TSP. Todos os achados citados anteriormente nos levam a acreditar que existe uma regulação dinâmica na expressão de CXCR4. Uma vez que PXN e CXCR4 estão superexpressos nos indivíduos com HAM/TSP, sugere que esta via está desregulada nesses indivíduos levando à migração das células T CD4⁺ para o sistema nervoso central. Não obstante, são necessários ensaios funcionais para indicar o real papel dos genes PXN e CXCR4 em linfócitos T CD4⁺ na infecção pelo HTLV-1. Apesar dos resultados da PXN estarem discordantes entre as técnicas de *microarray* e PCR quantitativa, podemos sugerir que PXN e CXCR4 estão atuando juntos nas células T CD4⁺ avaliadas neste estudo.

3. Genes associados à lise celular e as células T regulatórias (Treg)

Recentemente, vários estudos têm demonstrado que as células Treg apresentam capacidade citolítica e requerem a via perforina/granzima para exercerem essa atividade. Grossman et al. (2004) demonstraram que as células Treg ativadas expressam GZMA e/ou GZMB e podem matar várias células autólogas imunes, mas este mecanismo seria dependente de perforina. Ainda, Zhao et al. (2006) relataram que as células Treg de murinos ativadas suprimem a proliferação das células B pela via GZMB/PRF1.

Em virtude da importância das células Treg na resposta imunológica utilizando a via perforina/granzima, os genes GZMA, GZMB e PRF1 foram selecionados para validação. Além disso, os níveis de expressão de Foxp3, um dos principais marcadores das células Treg, também foram avaliados.

A perforina é uma proteína de 67 kDa e foi reconhecida pela primeira vez por sua habilidade de formar poros na membrana das células-alvo e induzir assim a lise em pH neutro e na presença de cálcio (PODACK & DENNERT, 1983; MASSON & TSCHOPP, 1985). Foi demonstrado que a perforina apresenta homologia na sequência e estrutura com a molécula C9 do sistema complemento (TSCHOPP et al., 1986). A partir dessa informação, pressupõe-se que a perforina promova a formação de poros na membrana que facilitam a entrada das granzimas nas células (TSCHOPP et al., 1986; PODACK et al., 1985; TRAPANI et al., 1990).

As granzimas constituem uma família de proteases capazes de iniciar o processo de apoptose na célula-alvo (PETERS et al., 1991). Até o momento, já foram descritas cinco granzimas humanas (A, B, H, K, M) cada qual com a sua localização e substrato específico

(GROSSMAN et al., 2003). As granzimas A e B são conhecidas por estarem envolvidas na apoptose de células alvo mediada por CTL. A GZMA cliva os resíduos de lisina e arginina, enquanto GZMB cliva os resíduos de procaspase aspartato e glutamina, resultando no processo de morte celular. A ativação das caspases induz a fragmentação do DNA e apoptose celular (POE et al., 1988; CAPUTO et al., 1994; HEUSEL et al., 1994). A via PRF1/GZMB é principalmente exercida pelos leucócitos circulantes, como CTLs e células NK (VACCA et al., 2001; DOUCEY et al., 2003). Dessa forma, essas células juntamente com as proteínas perforina e granzima, exercem um importante papel na resposta imunológica.

Os níveis de expressão gênica de PRF1 estavam elevados significativamente nos indivíduos com HAM/TSP quando comparados com os indivíduos dos grupos CT e HAC. Houve ainda, uma diferença de expressão significativa de PRF1 no grupo HAC em relação ao grupo CT. Os indivíduos infectados (HAC + HAM/TSP) apresentaram aumentos significativos nos níveis de expressão gênica de PRF1 em relação aos indivíduos saudáveis. Nenhuma diferença foi observada nos níveis de expressão protéica intracelular de PRF1 por citometria de fluxo. A expressão de GZMA estava significativamente elevada nos indivíduos do grupo HAM/TSP quando comparados com os indivíduos do grupo CT (2,3X) e HAC (2X). Nenhuma diferença foi observada entre a expressão de GZMB por PCR quantitativa e por citometria de fluxo. A quantificação dos níveis de expressão protéicos se mostra interessante, uma vez que a detecção da presença do RNAm não garante que a proteína será traduzida, ou ainda, se a mesma for traduzida não garante que será funcional. Desse modo, pode haver mecanismos pós-transcricionais importantes, como por exemplo, os microRNAs, que regulam a expressão dessas moléculas.

O fator transcricional Foxp3 é considerado um dos marcadores para as células Treg (HORI et al., 2003) juntamente com o CD25 (SAKAGUCHI et al., 1995). A expressão significativa de CD25^{hi} (high) tem sido amplamente utilizada para definição fenotípica de Treg (CD4⁺CD25^{hi}Foxp3⁺) (CROSS et al., 1987; INOUE et al., 1986). Dessa forma, a expressão do Foxp3 foi analisada por PCR quantitativa. Além disso, a porcentagem de células CD4⁺ e CD3⁺CD4⁺CD25^{hi} que expressavam Foxp3 foram analisadas por citometria de fluxo.

Na análise da expressão gênica do Foxp3, além de um aumento significativo no grupo HAM/TSP comparado com o grupo CT (2,8X) e HAC (2,2X) notou-se também um aumento significativo (1,9X) nos indivíduos do grupo infectado (HAC + HAM/TSP) em relação aos indivíduos do grupo CT. Ainda, houve uma correlação positiva entre Foxp3 e CPV e Foxp3 e Tax. Esses dados corroboram com o estudo de Toulza et al. (2008) que descreveram uma maior expressão de Foxp3⁺ nas células T CD4⁺ de indivíduos com HAM/TSP comparado com os indivíduos saudáveis. Além disso, os pesquisadores também observaram uma correlação positiva entre a expressão de Foxp3 e CPV e Foxp3 e Tax. Ao

contrário desses achados, Ramirez et al. (2010) descreveram que a média de RNAm Foxp3 foi menor nos indivíduos com HAM/TSP comparado com os indivíduos não infectados, e os autores encontraram uma forte correlação negativa entre Tax e Foxp3.

No referente estudo, as células $CD3^+CD4^+CD25^{hi}Foxp3^+$ não apresentaram nenhuma diferença entre os grupos CT, HAC e HAM/TSP. Entretanto, quando as células $CD4^+Foxp3^+$ foram analisadas, observou-se um aumento nos grupos HAC e HAM/TSP comparados com o grupo CT. Ainda, na comparação dessas células entre os indivíduos sadios e infectados, os últimos apresentaram maior expressão protéica confirmando os resultados obtidos por PCR quantitativa. Best et al. (2009) descreveram o aumento da expressão protéica nos indivíduos com HAM/TSP em relação aos indivíduos HAC e confirmam a correlação positiva entre $Foxp3^+CD4^+$ e CPV. Ao contrário desses achados, Oh et al. (2006) relataram uma menor expressão de $Foxp3^+$ nas células $CD4^+CD25^+$ no grupo HAM/TSP comparado com o grupo controle. Uma correlação negativa entre $Foxp3^+$ e CPV foi observada.

No presente trabalho observou-se um aumento na expressão de Foxp3, GZMA, PRF1 nos indivíduos com HAM/TSP. Os níveis de expressão de Foxp3 e PRF1 correlacionam-se positivamente com a carga proviral e com a expressão de Tax. Sabendo que as células Treg podem utilizar a via de perforina/granzima para suprimir as células T $CD8^+$ (CAO et al., 2007) e que essas células são responsáveis pela determinação da CPV, esses dados sugerem que o aumento da expressão de Foxp3 pode ser um dos principais determinantes da eficiência das células T no controle da resposta imune contra o HTLV-1. Dessa forma, as células Treg suprimem a atividade das células T $CD8^+$ pela via perforina/granzima, que por sua vez aumenta a carga proviral, aumentando assim o risco de desenvolvimento de HAM/TSP (Figura 22).

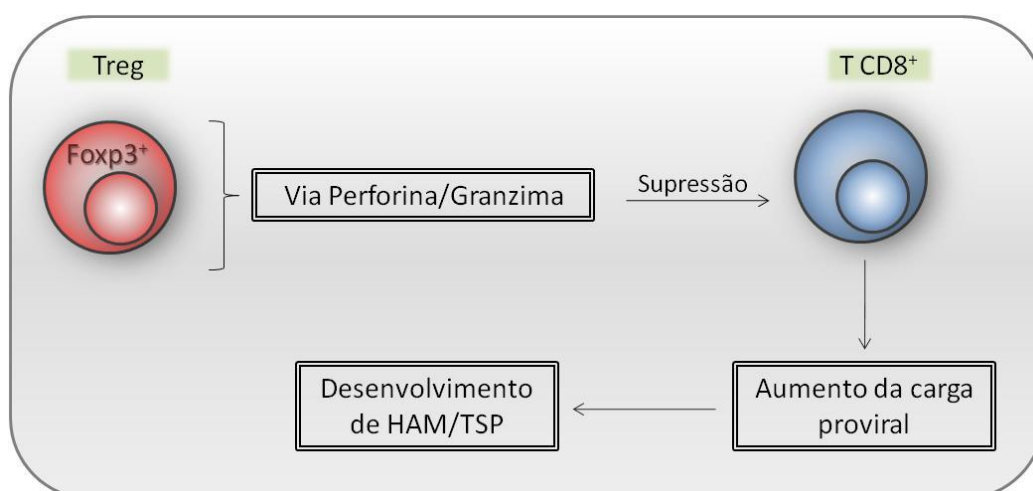


Figura 22. Hipótese do mecanismo de supressão das células T $CD8^+$ pelas Treg através da via perforina/granzima. Os linfócitos T $CD8^+$ determinam a carga proviral, entretanto, uma vez que os mesmos são suprimidos pelas Treg via perforina/granzima, ocorrerá um aumento na carga proviral, aumentando o risco de desenvolvimento de HAM/TSP.

Conclusões

VI. CONCLUSÕES

- Foram identificados 221, 254 e 70 genes diferencialmente expressos entre CT vs. HAC, CT vs. HAM/TSP e HAM/TSP vs. HAC, respectivamente.
- IL-27 encontrou-se com a expressão elevada nos indivíduos do grupo HAC comparados com os indivíduos do grupo HAM/TSP.
- Os resultados apontaram um aumento significativo nos níveis de expressão dos genes PXN, CXCR4, GZMA, PRF1 e Foxp3 no grupo HAM/TSP em relação ao grupo HAC.
- Os genes IL-27, PXN, PRF1 e Foxp3 estavam superexpressos nos indivíduos infectados (HAC + HAM/TSP) quando comparados com os indivíduos do grupo CT.
- A CPV e a expressão de Tax correlacionaram positivamente com os genes PRF1 e Foxp3.
- A porcentagem de células CD4⁺Foxp3⁺ é maior nos indivíduos infectados pelo HTLV-1 quando comparado ao grupo controle.
- O perfil de expressão gênica dos linfócitos T CD4⁺ demonstrou uma possível ocorrência de migração celular, provavelmente para o SNC. Esses dados foram suportados pelo aumento na expressão de PXN e CXCR4 que estão presentes na via de sinalização de CXCR4 que ocasiona na migração celular.
- As células Treg parecem suprimir a atividade das células T CD8⁺ pela via perforina/granzima, que por sua vez aumenta a carga proviral, aumentando assim o risco de desenvolvimento de HAM/TSP. Isso é sugerido pelo aumento de GZMA, PRF1 e Foxp3 nos indivíduos com HAM/TSP.

Referências Bibliográficas

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIUTI, A.; WEBB, I. J.; BLEUL, C.; SPRINGER, T. and GUTIERREZ-RAMOS, J. C. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. **J. Exp. Med.** v.185, p.111-120, 1997.

ALBRECHT, B.; COLLINS, N. D.; NEWBOUND, G. C.; RATNER, L. and LAIRMORE, M. D. Quantification of human T-cell lymphotropic virus type 1 proviral load by quantitative competitive polymerase chain reaction. **J Virol Methods.** v.75, p.123-140, 1998.

AMADI-OBI, A.; YU, C. R.; LIU, X.; MAHDI, R. M.; CLARKE, G. L.; NUSSENBLATT, R. B.; GERY, I.; LEE, Y. S. and EGWUAGU, C. E. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. **Nat Med.** v.13, p.711-718, 2007.

ARAI, M.; OHASHI, T.; TSUKAHARA, T.; MURAKAMI, T.; HORI, T.; UCHIYAMA, T.; YAMAMOTO, N.; KANNAGI, M. and FUJII, M. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein induces the expression of lymphocyte chemoattractant SDF-1/PBSF. **Virology.** v.241, p.298-303, 1998.

ARAUJO, A. Q. and SILVA, M. T. The HTLV-1 neurological complex. **Lancet Neurol.** v.5, p.1068-1076, 2006.

ASQUITH, B.; MOSLEY, A. J.; HEAPS, A.; TANAKA, Y.; TAYLOR, G. P.; MCLEAN, A. R. and BANGHAM, C. R. Quantification of the virus-host interaction in human T lymphotropic virus I infection. **Retrovirology.** v.2, p.75, 2005.

BANGHAM, C. R. HTLV-1 infections. **J Clin Pathol.** v.53, p.581-586, 2000.

BANGHAM, C. R. and OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. **Oncogene.** v.24, p.6035-6046, 2005.

BATTEN, M.; LI, J.; YI, S.; KLJAVIN, N. M.; DANILENKO, D. M.; LUCAS, S.; LEE, J.; DE SAUVAGE, F. J. and GHILARDI, N. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. **Nat. Immunol.** v.7, p.929-936, 2006.

BAZARBACHI, A. and HERMINE, O. Treatment of adult Tcell leukaemia/lymphoma: current strategy and future perspectives. **Virus Res.** v.78, p.79-92, 2001.

BEST, I.; LÓPEZ, G.; VERDONCK, K.; GONZÁLEZ, E.; TIPISMANA, M.; GOTUZZO, E.; VANHAM, G. and CLARK, D. IFN- γ production in response to Tax 161-233, and frequency of

CD4+ Foxp3+ and Lin-HLA-DRhigh CD123+ cells, discriminate HAM/TSP patients from asymptomatic HTLV-1-carriers in a Peruvian population. **Immunology**. v.128, p.777-786, 2009.

BLEUL, C. C.; FARZAN, M.; CHOE, H.; PAROLIN, C.; CLARK-LEWIS, I.; SODROSKI, J. and SPRINGER, T. A. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. **Nature**. v.382, p.829-833, 1996.

CALATTINI, S.; CHEVALIER, S. A.; DUPREZ, R.; BASSOT, S.; FROMENT, A.; MAHIEUX, R. and GESSAIN, A. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**. v.2, p.30, 2005.

CAO, X.; CAI, S. F.; FEHNIGER, T. A.; SONG, J.; COLLINS, L. I.; PIWNICA-WORMS, D. R.; LEY, T. J. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. **Immunity**. v.27, p.635-646, 2007.

CAPUTO, A.; JAMES, M.; POWERS, J.; HUDIG, D. and BLEACKLEY, R. Conversion of the substrate specificity of mouse proteinase granzyme B. **Nat Struct Biol**. v.1, p.364-7, 1994.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; RIBAS, J. G. R.; CATALAN-SOARES, B. C.; MARTINS, M. L.; BRITO-MELO, G. E. A.; MARTINS-FILHO, O. A.; et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.35, p.499-508, 2002.

CATALAN-SOARES, B.; PROIETTI, F. A. and CARNEIRO-PROIETTI, A. B. Os vírus linfotrópicos de células T humanas (HTLV) na última década (1990-2000). Aspectos epidemiológicos. **Rev. Bras. Epidemiol**. v.4, p.81-95, 2001.

CAVROIS, M.; GESSAIN, A.; GOUT, O.; WAIN-HOBSON, S. and WATTEL, E. Common human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) integration sites in cerebrospinal fluid and blood lymphocytes of patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis indicate that HTLV-1 crosses the blood-brain barrier via clonal HTLV-1-infected cells. **J Infect Dis**. v.182, p.1044-1050, 2000.

CHOI, B.; GATTI, P. J.; FERMIN, C. D.; VIGH, S.; HAISLIP, A. M. and GARRY, R. F. Down-regulation of cell surface CXCR4 by HIV-1. **Virology**. v.5, p.6, 2008.

CROSS, S. L.; FEINBERG, M. B.; WOLF, J. B.; HOLBROOK, N. J.; WONG-STAAAL, F. and LEONARD, W. J. Regulation of the human interleukin-2 receptor alpha chain promoter: activation of a nonfunctional promoter by the transactivator gene of HTLV-I. **Cell**. v.49, p.47-56, 1987.

DE THE, G. and BOMFORD, R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? **AIDS Res Hum Retroviruses**. p.381-386, 1993.

DOUCEY, M.; LEGLER, D.; FAROUDI, M.; BOUCHERON, N.; BAUMGAERTNER, P.; NAEHER, D.; CEBECAUER, M.; HUDRISIER, D.; RÜEGG, C.; PALMER, E.; VALITUTTI, S.; BRON, C. and LUESCHER, I. The beta1 and beta3 integrins promote T cell receptor-mediated cytotoxic T lymphocyte activation. **J Biol Chem.** v.278, p.26983-91, 2003.

DUTT, P.; WANG, J. F. and GROOPMAN, J. E. Stromal cell-derived factor-1 alpha and stem cell factor/kit ligand share signaling pathways in hemopoietic progenitors: a potential mechanism for cooperative induction of chemotaxis. **J Immunol.** v.161, p.3652-3658, 1998.

ETOH, K.; TAMIYA, S.; YAMAGUCHI, K.; OKAYAMA, A.; TSUBOUCHI, H.; IDETA, T.; MUELLER, N.; TAKATSUKI, K. and MATSUOKA, M. Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells *in vivo*. **Cancer Res.** v.57, p.4862-4867, 1997.

FAKRUDDIN, J. M.; LEMPICKI, R. A.; GORELICK, R. J.; YANG, J.; ADELSBERGER, J. W.; GARCIA-PINERES, A. J.; PINTO, L. A.; LANE, H. C. and IMAMICHI, T. Noninfectious papilloma virus-like particles inhibit HIV-1 replication: implications for immune control of HIV-1 infection by IL-27. **Blood.** v.109, p.1841-1849, 2007.

FENG, Y.; BRODER, C. C.; KENNEDY, P. E. and BERGER, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. **Science.** v.272, p.872-877, 1996.

FERREIRA JÚNIOR, O. C.; VAZ, R. S.; CARVALHO, M. B.; GUERRA, C.; FABRON, A. L. and HAMERSCHLAK, N. Human T-lymphotropic virus type I and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from São Paulo, Brasil. **Transfusion.** v.35, p.258-63, 1995.

FRANCHINI, G. and STREICHER, H. Human T-cell leukemia virus. **Baillieres Clin Haematol.** v.8, p.131-148, 1995.

FRANK, A. C.; ZHANG, X.; KATSOUNAS, A.; BHARUCHA, J. P.; KOTILIL, S. and IMAMICHI, T. Interleukin-27, an anti-HIV-1 cytokine, inhibits replication of hepatitis C virus. **J Interferon Cytokine Res.** v.30, p.427-31, 2010.

GALVÃO-CASTRO, B.; LOURES, L.; RODRIGUES, L. G.; SERENO, A.; FERREIRA JUNIOR, O. C.; FRANCO, L. G.; MULLER, M.; SAMPAIO, D. A.; SANTANA, A.; PASSOS, L. M. and PROIETTI, F. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors; a nationwide Brazilian study. **Transfusion.** v.37, p.242-3, 1997.

GANJU, R. K.; BRUBAKER, S. A.; MEYER, J.; DUTT, P.; YANG, Y.; QIN, S.; NEWMAN, W. and GROOPMAN, J. E. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. **J Biol Chem.** v.273, p.23169-23175, 1998.

GESSAIN, A.; BARIN, F.; VERNANT, J. C.; GOUT, O.; MAURS, L.; CALENDER, A. and DE THE, G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**. v.2, p.407-410, 1985.

GOON, P. K.; IGAKURA, T.; HANON, E.; MOSLEY, A. J.; BARFIELD, A.; BARNARD, A. L.; KAFTANTZI, L.; TANAKA, Y.; TAYLOR, G. P.; WEBER, J. N. and BANGHAM, C. R. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD4+ T cells: immunodominance hierarchy and preferential infection with HTLV-I. **Journal of Immunology**. v.172, p.1735-1743, 2004.

GOON, P. K.; HANON, E.; IGAKURA, T.; TANAKA, Y.; WEBER, J. N.; TAYLOR, G. P. and BANGHAM, C. R. High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Blood**. v.99, p.3335-41, 2002.

GRANT, C.; BARMAK, K.; ALEFANTIS, T.; YAO, J.; JACOBSON, S. and 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**. v.190, p.133-159, 2002.

GREENWELL-WILD, T.; VAZQUEZ, N.; JIN, W.; RANGEL, Z.; MUNSON, P. and WAHL, S. M. IL-27 inhibition of HIV-1 involves an intermediate induction of type I IFN. **Blood**. v.114, p.1864-1874, 2009.

GROSSMAN, W. J.; REVELL, P. A.; LU, Z. H.; JOHNSON, H.; BREDEMEYER, A. J. and LEY, T. J. The orphan granzymes of humans and mice. **Curr Opin Immunol**. v.15, p.544-552, 2003.

GROSSMAN, W. J.; VERBSKY, J. W.; BARCHET, W.; COLONNA, M.; ATKINSON, J. P. and LEY, T.J. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. **Immunity**. v.21, p.589-601, 2004.

GUINAMARD, R.; SIGNORET, N.; ISHIAI, M.; MARSH, M.; KUROSAKI, T. and RAVETCH, J. V. B cell antigen receptor engagement inhibits stromal cell-derived factor (SDF)-1alpha chemotaxis and promotes protein kinase C (PKC)-induced internalization of CXCR4. **J Exp Med**. v.189, p.1461-1466, 1999.

GUPTA, S. K.; LYSKO, P. G.; PILLARISETTI, K.; OHLSTEIN, E. and STADEL, J. M. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. **J Biol Chem**. v.273, p.4282-4287, 1998.

HANON, E.; HALL, S.; TAYLOR, G. P.; SAITO, M.; DAVIS, R.; TANAKA, Y.; USUKU, K.; OSAME, M.; WEBER, J. N. and BANGHAM, C. R. Abundant Tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. **Blood**. v.95, p.1386-1392, 2000.

HASHIMOTO, K.; HIGUCHI, I.; OSAME, M. and IZUMO, S. Quantitative in situ PCR assay of HTLV-1 infected cells in peripheral blood lymphocytes of patients with ATL, HAM/TSP and asymptomatic carriers. **J Neurol Sci.** v.159, p.67-72, 1998.

HAYASHI, D.; KUBOTA, R.; TAKENOUCI, N.; TANAKA, Y.; HIRANO, R.; TAKASHIMA, H.; OSAME, M.; IZUMO, S. and ARIMURA, K. Reduced Foxp3 expression with increased cytomegalovirus-specific CTL in HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of Neuroimmunology.** v.200, p.115-124, 2008.

HEUSEL, J.; WESSELSCHMIDT, R.; SHRESTA, S.; RUSSELL, J. and LEY, T. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. **Cell.** v.76, p.977-87, 1994.

HORI, S.; NOMURA, T. and SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science.** v.299, p.1057-61, 2003.

IJICHI, S.; IZUMO, S.; EIRAKU, N.; MACHIGASHIRA, K.; KUBOTA, R.; NAGAI, M.; IKEGAMI, N.; KASHIO, N.; UMEHARA, F.; MARUYAMA, I. and et al. An autoaggressive process against bystander tissues in HTLV-I-infected individuals: a possible pathomechanism of HAM/TSP. **Med Hypotheses.** p.542-547, 1993.

IMAMICHI, T.; YANG, J.; HUANG, D. W.; BRANN, T. W.; FULLMER, B. A.; ADELSBERGER, J. W.; LEMPICKI, R. A.; BASELER, M. W. and LANE, H. C. IL-27, a novel anti-HIV cytokine, activates multiple interferon-inducible genes in macrophages. **AIDS.** v.22, p.39-45, 2008.

INOUE, J.; SEIKI, M.; TANIGUCHI, T.; TSURU, S. and YOSHIDA, M. Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40x encoded by human T-cell leukemia virus type 1. **EMBO J.** v.5, p.2883-2888, 1986.

JACOBSON, S. Cellular immune responses to HTLV-I: immunopathogenic role in HTLV-I-associated neurologic disease. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** v.13 Suppl 1, p.S100-106, 1996.

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

JACOBSON, S.; SHIDA, H.; MCFARLIN, D. E.; FAUCI, A. S. and KOENIG, S. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. **Nature.** v.348, p.245-248, 1990.

JAZIN, E. E.; SODERSTROM, S.; EBENDAL, T. and LARHAMMAR, D. Embryonic expression of the mRNA for the rat homologue of the fusin/CXCR-4 HIV-1 co-receptor. **J. Neuroimmunol.** v.79, p.148-154, 1997.

JEANG, K. T. Functional activities of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein: cellular signaling through NF-kappa B. **Cytokine Growth Factor Rev.** v.12, p.207-217, 2001.

JONES, K. S.; FUGO, K.; PETROW-SADOWSKI, C.; HUANG, Y.; BERTOLETTE, D. C.; LISINSKI, I.; CUSHMAN, S. W.; JACOBSON, S. and 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.** v.80, p.8291-8302, 2006.

KALYANARAMAN, V. S.; SARNGADHARAN, M. G.; ROBERT-GUROFF, M.; MIYOSHI, I.; GOLDE, D. and GALLO, R. C. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science.** v.218, p.571-573, 1982.

KANNAGI, M.; HARADA, S.; MARUYAMA, I.; INOKO, H.; IGARASHI, H.; KUWASHIMA, G.; SATO, S.; MORITA, M.; KIDOKORO, M.; SUGIMOTO, M. and et al. Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8+ cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells. **International Immunology.** v.3, p.761-767, 1991.

KAPLAN, J. E.; KHABBAZ, R. F.; MURPHY, E. L.; HERMANSEN, S.; ROBERTS, C.; LAL, R.; HENEINE, W.; WRIGHT, D.; MATIJAS, L.; THOMSON, R.; RUDOLPH, D.; SWITZER, W. M.; KLEINMAN, S.; BUSCH, M.; SCHREIBER, G. B. Male to female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. **J Acquir Immune Defic Syndr Human Retrovirol.** v.12, p.193-201, 1996.

KASHIMA, S.; ALCANTARA, L. C.; TAKAYANAGUI, O. M.; CUNHA, M. A.; CASTRO, B. G.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S.; ZAGO, M. A. and 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, p.953-959, 2006.

KAWAGUCHI, A.; ORBA, Y.; KIMURA, T.; IHA, H.; OGATA, M.; TSUJI, T.; AINAI, A.; SATA, T.; OKAMOTO, T.; HALL, W. W.; SAWA, H. and HASEGAWA, H. Inhibition of the SDF-1alpha-CXCR4 axis by the CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses the migration of cultured cells from ATL patients and murine lymphoblastoid cells from HTLV-I Tax transgenic mice. **Blood.** v.114, p.2961-8, 2009.

KUBOTA, R.; KAWANISHI, T.; MATSUBARA, H.; MANNS, A. and JACOBSON, S. Demonstration of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax-specific CD8+ lymphocytes directly in peripheral blood of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by intracellular cytokine detection. **J Immunol.** v.161, p.482-488, 1998.

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

LAROUSSERIE, F.; BARDEL, E.; PFLANZ, S.; ARNULF, B.; LOME-MALDONADO, C.; HERMINE, O.; BRÉGEAUD, L.; PERENNEC, M.; BROUSSE, N.; KASTELEIN, R. and DEVERGNE, O. Analysis of interleukin-27 (EBI3/p28) expression in Epstein-Barr virus- and

human T-cell leukemia virus type 1-associated lymphomas: heterogeneous expression of EB13 subunit by tumoral cells. **Am J Pathol.** v.166, p.1217-28, 2005.

LEVIN, M. C. and JACOBSON, S. Cellular and humoral immune responses associated with HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Ann N Y Acad Sci.** v.835, p.142-52, 1997.

LIMA, M. A.; BICA, R. B. and ARAUJO, A. Q. Gender influence on the progression of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry.** v.76, p.294-296, 2005.

MANNING, A. and BLATTNER, W. A. The epidemiology of the human T-cell lymphotropic virus type I and type II: etiologic role in human disease. **Transfusion.** v.31, p.67-75, 1991.

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

MARIETTE, X.; AGBALIKA, F.; ZUCKER-FRANKLIN, D.; CLERC, D.; JANIN, A.; CHEROT, P. and BROUET, J. C. Detection of the tax gene of HTLV-I in labial salivary glands from patients with Sjogren's syndrome and other diseases of the oral cavity. **Clin Exp Rheumatol.** v.18, p.341-347, 2000.

MASSON, D. and TSCHOPP, J. Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. **J Biol Chem.** v.260, p.9069-9072, 1985.

MATSUZAKI, T.; NAKAGAWA, M.; NAGAI, M.; USUKU, K.; HIGUCHI, I.; ARIMURA, K.; KUBOTA, H.; IZUMO, S.; AKIBA, S. and OSAME, M. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients followed up for 10 years. **Journal of Neurovirology.** v.7, p.228-234, 2001.

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

MOCHIZUKI, M.; ONO, A.; IKEDA, E.; HIKITA, N.; WATANABE, T.; YAMAGUCHI, K.; SAGAWA, K. and ITO, K. HTLV-I uveitis. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** v.13 Suppl 1, p.S50-56, 1996.

MOEPPS, B.; FRODL, R.; RODEWALD, H. R.; BAGGIOLINI, M. and GIERSCHIK, P. Two murine homologues of the human chemokine receptor CXCR4 mediating stromal cell-derived factor 1alpha activation of Gi2 are differentially expressed in vivo. **Eur. J. Immunol.** v.27, p.2102-2112, 1997.

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

MOREY, J. S.; RYAN, J. C. and VAN DOLAH, F. M. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. **Biol Proced Online.** v.8, p.175-93, 2006.

MORGAN, O. S.; RODGERS-JOHNSON, P.; MORA, C. and CHAR, G. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. **Lancet.** v.2, p.1184-1187, 1989.

MORITOYO, T.; IZUMO, S.; MORITOYO, H.; TANAKA, Y.; KIYOMATSU, Y.; NAGAI, M.; USUKU, K.; SORIMACHI, M. and OSAME, M. Detection of human Tlymphotropic virus type I p40tax protein in cerebrospinal fluid cells from patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J Neurovirol.** v.5, p.241-248, 1999.

MUELLER, N. The epidemiology of HTLV-I infection. **Cancer Causes Control.** v.2, p.37-52, 1991.

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.** v.111, p.555-60, 1989.

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

NAGAI, M.; YAMANO, Y.; BRENNAN, M. B.; MORA, C. A. and JACOBSON, S. Increased HTLV-I proviral load and preferential expansion of HTLV-I Tax-specific CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from patients with HAM/TSP. **Ann Neurol.** v.50, p.807-812, 2001.

NIEDBALA, W.; CAI, B.; WEI, X.; PATAKAS, A.; LEUNG, B. P.; MCINNIS, I. B. and LIEW, F. Y. Interleukin-27 attenuates collagen-induced arthritis. **Ann. Rheum. Dis.** v.67, p.1474-1479, 2008.

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

NOSE, H.; KUBOTA, R.; SETH, N. P.; GOON, P. K.; TANAKA, Y.; IZUMO, S.; USUKU, K.; OHARA, Y.; WUCHERPFENNIG, K. W.; BANGHAM, C. R.; OSAME, M. and SAITO, M. Ex vivo analysis of human T lymphotropic virus type 1-specific CD4⁺ cells by use of a major

histocompatibility complex class II tetramer composed of a neurological disease-susceptibility allele and its immunodominant peptide. **J Infect Dis.** v.196, p.1761-1772, 2007.

OH, U.; GRANT, C.; GRIFFITH, C.; FUGO, K.; TAKENOUCI, N. and JACOBSON, S. Reduced Foxp3 protein expression is associated with inflammatory disease during human T lymphotropic virus type 1 infection. **Journal of Infectious Diseases.** v.193, p.1557-1566, 2006.

OKAMOTO, T.; OHNO, Y.; TSUGANE, S.; WATANABE, S.; SHIMOYAMA, M.; TAJIMA, K.; MIWA, M. and SHIMOTOHNO, K. Multi-step carcinogenesis model for adult T-cell leukemia. **Jpn J Cancer Res.** v.80, p.191-195, 1989.

OLIÈRE, S.; HERNANDEZ, E.; LÉZIN, A.; ARGUELLO, M.; DOUVILLE, R.; NGUYEN, T. L.; OLINDO, S.; PANELATTI, G.; KAZANJI, M.; WILKINSON, P.; SÉKALY, R. P.; CÉSAIRE, R. and HISCOTT, J. HTLV-1 evades type I interferon antiviral signaling by inducing the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1). **PLoS Pathog.** v.6(11):e1001177, 2010.

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

OSAME, M.; USUKU, K.; IZUMO, S.; IJICHI, N.; AMITANI, H.; IGATA, A.; MATSUMOTO, M. and TARA, M. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet.** v.1, p.1031-1032, 1986.

PETERS, P. J.; BORST, J.; OORSCHOT, V.; FUKUDA, M.; KRAHENBUHL, O.; TSCHOPP, J.; SLOT, J. W. and GEUZE, H. J. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. **J Exp Med.** v.173, p.1099-1109, 1991.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** v.29, p.e45, 2001.

PFLANZ, S.; TIMANS, J. C.; CHEUNG, J.; ROSALES, R.; KANZLER, H.; GILBERT, J.; HIBBERT, L.; CHURAKOVA, T.; TRAVIS, M.; VAISBERG, E.; BLUMENSCHEN, W. M.; MATTSON, J. D.; WAGNER, J. L.; TO, W.; ZURAWSKI, S.; MCCLANAHAN, T. K.; GORMAN, D. M.; BAZAN, J. F.; DE WAAL MALEFYT, R.; RENNICK, D. and KASTELEIN, R. A. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. **Immunity.** v.16, p.779-790, 2002.

PODACK, E. R. and DENNERT, G. Assembly of two types of tubules with putative cytolytic function by cloned natural killer cells. **Nature.** v.302, p.442-445, 1983.

PODACK, E. R.; KONIGSBERG, P. J.; ACHA-ORBEA, H.; PIRCHER, H. and HENGARTNER, H. Cytolytic T-cell granules: biochemical properties and functional specificity. **Adv Exp Med Biol.** v.184, p.99-119, 1985.

POE, M.; BENNETT, C. D.; BIDDISON, W. E.; BLAKE, J. T.; NORTON, G. P.; RODKEY, J. A.; SIGAL, N. H.; TURNER, R. V.; WU, J. K. and ZWEERINK, H. J. Human cytotoxic lymphocyte tryptase. Its purification from granules and the characterization of inhibitor and substrate specificity. **J Biol Chem.** v.263, p.13215-13222, 1988.

POIESZ, B. J.; RUSCETTI, F. W.; GAZDAR, A. F.; BUNN, P. A.; MINNA, J. D. and 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 U S A.** v.77, p.7415-7419, 1980.

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

RAMIREZ, E.; CARTIER, L.; RODRIGUEZ, L.; ALBERTI, C. and VALENZUELA, M. A. In vivo fluctuation of Tax, Foxp3, CTLA-4, and GITR mRNA expression in CD4(+)CD25(+) T cells of patients with human T-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy. **Braz J Med Biol Res.** v.43, p.1109-1115, 2010.

RICHARDSON, J. H.; EDWARDS, A. J.; CRUICKSHANK, J. K.; RUDGE, P. and DALGLEISH, A. G. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. **J Virol.** v.64, p.5682-5687, 1990.

ROMAN, G. C. and OSAME, M. Identity of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. **Lancet.** v.1, p.651, 1988.

ROMAN, G. C. and ROMAN, L. N. Tropical spastic paraparesis. A clinical study of 50 patients from Tumaco (Colombia) and review of the worldwide features of the syndrome. **J Neurol Sci.** v.87, p.121-38, 1988.

SAKAGUCHI, S.; ONO, M.; SETOGUCHI, R.; YAGI, H.; HORI, S.; FEHERVARI, Z.; SHIMIZU, J.; TAKAHASHI, T. and NOMURA, T. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. **Immunological Reviews.** v.212, p.8-27, 2006.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M. and TODA, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J Immunol.** v.155, p.1151-64, 1995.

SCHENA, M.; SHALON, D.; DAVIS, R. W. and BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science.** v.270, p.467-70, 1995.

SEIKI, M.; HATTORI, S.; HIRAYAMA, Y. and YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v.80, p.3618-3622, 1983.

SHALON, D.; SMITH, S. J. and BROWN, P. O. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. **Genome Research.** v.6, p.639-645, 1996.

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

SOTSIOS, Y.; WHITTAKER, G. C.; WESTWICK, J. and WARD, S. G. The CXC chemokine stromal cell- derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. **J Immunol.** v.163, p.5954-5963, 1999.

STURN, A. Cluster analysis for large scale gene expression studies. Rockville, 2000. 67 p.

TAKENOUCHI, N.; YAMANO, Y.; USUKU, K.; OSAME, M. and IZUMO, S. Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **J Neurovirol.** v.9, p.29-35, 2003.

TAN, P. K.; DOWNEY, T. J.; SPITZNAGEL, E. L. JR.; XU, P.; FU, D.; DIMITROV, D. S.; LEMPICKI, R. A.; RAAKA, B. M. and CAM, M. C. Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. **Nucl Acids Res.** v.31, p.5676-5684, 2003.

TOULZA, F.; HEAPS, A.; TANAKA, Y.; TAYLOR, G. P. and BANGHAM, C. R. High frequency of CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. **Blood.** v.111, p.5047-5053, 2008.

TRAPANI, J. A.; KWON, B. S.; KOZAK, C. A.; CHINTAMANENI, C.; YOUNG, J. D. and DUPONT, B. Genomic organization of the mouse pore-forming protein (perforin) gene and localization to chromosome 10. Similarities to and differences from C9. **J Exp Med.** v.171, p.545-557, 1990.

TSCHOPP, J.; MASSON, D. and STANLEY, K. K. Structural / functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Nature.** v.322, p.831-834, 1986.

TURNER, C. E. Paxillin. **Int J Biochem Cell Biol.** v.30, p.955-959, 1998.

TURNER, C. E.; GLENNEY, J. R., JR. and BURRIDGE, K. Paxillin: a new vinculin-binding protein present in focal adhesions. **J Cell Biol.** v.111, p.1059-1068, 1990.

TWIZERE, J. C.; SPRINGAEL, J. Y.; BOXUS, M.; BURNY, A.; DEQUIEDT, F.; DEWULF, J. F.; DUCHATEAU, J.; PORTETELLE, D.; URBAIN, P.; VAN LINT, C.; GREEN, P. L.; MAHIEUX, R.; PARMENTIER, M.; WILLEMS, L. and KETTMANN, R. Human T-cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein regulates G-protein signaling. **Blood**. v.109, p.1051-60, 2007.

UCHIYAMA, T.; YODOI, J.; SAGAWA, K.; TAKATSUKI, K. and UCHINO, H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. **Blood**. v.50, p.481-492, 1977.

UMEHARA, F.; IZUMO, S.; NAKAGAWA, M.; RONQUILLO, A. T.; TAKAHASHI, K.; MATSUMURO, K.; SATO, E. and OSAME, M. Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. **J Neuropathol Exp Neurol**. v.52, p.424-30, 1993.

UMEHARA, F.; IZUMO, S.; TAKEYA, M.; TAKAHASHI, K.; SATO, E. and OSAME M. Expression of adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1) in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. **Acta Neuropathol**. v.91, p.343-350, 1996.

VACCA, A.; RIA, R.; PRESTA, M.; RIBATTI, D.; IURLARO, M.; MERCHIONNE, F.; TANGHETTI, E. and DAMMACCO, F. Alpha(v)beta(3) integrin engagement modulates cell adhesion, proliferation, and protease secretion in human lymphoid tumor cells. **Exp Hematol**. v.29, p.993-1003, 2001.

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

VERNANT, J. C.; MAURS, L.; GESSAIN, A.; BARIN, F.; GOUT, O.; DELAPORTE, J. M.; SANHADJI, K.; BUISSON, G. and DE-THÉ, G. Endemic tropical spastic paraparesis associated with human T-lymphotropic virus type I: a clinical and seroepidemiological study of 25 cases. **Ann Neurol**. v.21, p.123-30, 1987.

VICENTE-MANZANARES, M.; REY, M.; JONES, D.R.; SANCHO, D.; MELLADO, M.; RODRIGUEZ-FRADE, J.M.; DEL POZO, M.A.; YÁÑEZ-MÓ, M.; DE ANA, A.M.; MARTÍNEZ-A, C.; MÉRIDA, I. and SÁNCHEZ-MADRID, F. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase in stromal cell-derived factor-1 alpha-induced lymphocyte polarization and chemotaxis. **J Immunol**. v.163, p.4001-4012, 1999.

VILLARINO, A. V.; HUANG, E. and HUNTER, C. A. Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27. **J Immunol**. v.173, p.715-720, 2004.

VINE, A. M.; HEAPS, A. G.; KAFTANTZI, L.; MOSLEY, A.; ASQUITH, B.; WITKOVER, A.; THOMPSON, G.; SAITO, M.; GOON, P. K.; CARR, L.; MARTINEZ-MURILLO, F.; TAYLOR, G. P. and BANGHAM, C. R. The role of CTLs in persistent viral infection: cytolytic gene expression in CD8+ lymphocytes distinguishes between individuals with a high or low proviral load of human T cell lymphotropic virus type 1. **J Immunol**. v.173, p.5121-5129, 2004.

WANG, J. F.; PARK, I. W. and GROOPMAN, J. E. Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. **Blood**. v.95, p.2505-2513, 2000.

WANG, J.; WANG, G.; SUN, B.; LI, H.; MU, L.; WANG, Q.; LI, G.; SHI, L.; JIN, L. and KOSTULAS, N. Interleukin-27 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis during bone marrow stromal cell treatment. **J Autoimmun**. v.30, p.222-229, 2008.

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. and SWITZER, W. M. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v.102, p.7994-7999, 2005.

YAMAGUCHI, K. Human T-lymphotropic virus type I in Japan. **Lancet**. v.343, p.213-216, 1994.

YAMANO, Y.; TAKENOUCI, N.; LI, H. C.; TOMARU, U.; YAO, K.; GRANT, C. W.; MARIC, D. A. and JACOBSON, S. Virus-induced dysfunction of CD4+CD25+ T cells in patients with HTLV-I-associated neuroimmunological disease. **Journal of Clinical Investigation**. v.115, no. 5, p.1361-1368, 2005.

YASUKAWA, M.; HASEGAWA, A.; SAKAI, I.; OHMINAMI, H.; ARAI, J.; KANEKO, S.; YAKUSHIJIN, Y.; MAEYAMA, K.; NAKASHIMA, H.; ARAKAKI, R. and FUJITA, S. Down-regulation of CXCR4 by human herpesvirus 6 (HHV-6) and HHV-7. **J Immunol**. v.162, p.5417-5422, 1999.

YAUK, C. L.; BERNDT, M. L.; WILLIAMS, A. and DOUGLAS, G. R. Comprehensive comparison of six microarray technologies. **Nucl Acids Res**. v.32, p.124, 2004.

YOSHIDA, M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. **Annu Rev Immunol**. v.19, p.475-496, 2001.

YOSHIMURA, T.; TAKEDA, A.; HAMANO, S.; MIYAZAKI, Y.; KINJYO, I.; ISHIBASHI, T.; YOSHIMURA, A. and YOSHIDA, H. Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4₊ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4₊ T cells partially through STAT3-dependent mechanism. **J. Immunol**. v.177, p.5377-5385, 2006.

ZHAO, D. M.; THORNTON, A. M.; DIPAOLO, R. J. and SHEVACH, E. M. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. **Blood**. v.107, p.3925-3932, 2006.

ZHU, B.; PING, G.; SHINOHARA, Y.; ZHANG, Y.; BABA, Y. Comparison of gene expression measurements from cDNA and 60-mer oligonucleotide microarrays. **Genomics**. v.85, p.657-665, 2005.

Apêndices

APÊNDICES

APÊNDICE A – Lista dos 221 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAC. O grupo CT apresentou 185 genes mais expressos e 36 genes menos expressos comparados com o grupo HAC.

Genes	Sondas	Fold Change	Genes	Sondas	Fold Change
MALAT1	A_24_P829261	-13.84	PABPC1	A_32_P152673	-2.45
ZBTB20	A_32_P179526	-8.38	PRPF4B	A_24_P941787	-2.45
MALAT1	A_24_P497244	-8.29	TBC1D3F	A_23_P164210	-2.44
IKZF1	A_23_P124934	-8.05	SRSF2	A_23_P77776	-2.44
LOC727820	A_32_P104619	-7.00	ATXN2L	A_23_P124661	-2.43
ILDR1	A_23_P109907	-6.80	AGAP1	A_32_P55161	-2.43
NEAT1	A_24_P566916	-6.59	USP42	A_24_P135276	-2.43
TMC8	A_23_P152992	-6.29	DKFZp434F142	A_23_P111797	-2.42
UBOX5	A_23_P218717	-6.21	FAN1	A_23_P377888	-2.40
ORAI1	A_23_P150919	-6.17	PION	A_23_P416894	-2.39
AHSA2	A_23_P372467	-5.88	TXK	A_23_P302018	-2.38
MYLIP	A_24_P917123	-5.70	RPAIN	A_24_P307785	-2.37
PDZD7	A_23_P75097	-5.51	EGFL8	A_23_P424582	-2.37
USP34	A_32_P81173	-5.48	ABCA5	A_24_P67096	-2.36
MALAT1	A_24_P873659	-5.34	NFAT5	A_23_P359647	-2.36
LENG8	A_24_P40055	-5.14	SPSB4	A_23_P258381	-2.35
PXN	A_23_P13969	-5.12	TMC8	A_23_P346093	-2.35
ALPK1	A_23_P144531	-5.07	D2HGDH	A_23_P376627	-2.33
RBBP6	A_23_P54781	-5.00	ENO3	A_23_P130149	-2.33
ATHL1	A_23_P98686	-4.80	IVNS1ABP	A_32_P205895	-2.33
ZKSCAN1	A_23_P94063	-4.71	SON	A_23_P402733	-2.32
HNRPDL	A_24_P260300	-4.69	MEGF6	A_24_P926960	-2.32
LOC150759	A_24_P391591	-4.65	LOC221442	A_24_P303420	-2.32
RAX2	A_23_P56150	-4.64	CCNL2	A_23_P217899	-2.32
ANKK1	A_23_P35943	-4.64	CAPN1	A_24_P544543	-2.31
TBRG1	A_24_P931636	-4.63	ZBTB20	A_23_P40866	-2.31
TPM2	A_23_P216501	-4.57	PAG1	A_23_P347070	-2.29
BBS5	A_23_P252642	-4.55	RBM26	A_23_P218096	-2.29
KLC3	A_23_P4653	-4.54	TRA2A	A_24_P929807	-2.28
GGT6	A_23_P66774	-4.53	CCDC45	A_23_P307400	-2.28
PPP2R5C	A_24_P76898	-4.52	PAPD7	A_23_P18824	-2.27
STK4	A_24_P935026	-4.49	BIN2	A_23_P162386	-2.25
SDCBP	A_23_P168974	-4.40	LOC642826	A_32_P124493	-2.25
CCNL1	A_23_P132454	-4.38	RICTOR	A_32_P193322	-2.24
MYO1C	A_23_P164022	-4.18	JMJD7-PLA2G4B	A_23_P403424	-2.23
PLXDC1	A_23_P3911	-4.17	TSEN54	A_24_P205008	-2.22
LOC338799	A_23_P116743	-4.13	MAN2A2	A_23_P206041	-2.22
SLC35E4	A_23_P259357	-4.04	LPHN1	A_23_P208551	-2.22
PDE4C	A_23_P119583	-4.03	PDE4DIP	A_23_P200801	-2.21
MGC10814	A_23_P79032	-4.01	CTNNB1	A_24_P608330	-2.20

APÊNDICE A – Lista dos 221 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAC. O grupo CT apresentou 185 genes mais expressos e 36 genes menos expressos comparados com o grupo HAC (continuação).

Genes	Sondas	Fold Change	Genes	Sondas	Fold Change
PNN	A_23_P99582	-3.87	MIR17HG	A_32_P139196	-2.20
AMY1C	A_23_P23611	-3.87	CHD7	A_32_P150012	-2.19
GALNT3	A_23_P209459	-3.86	EIF5	A_24_P398810	-2.19
GOLGA8F	A_24_P384588	-3.77	FAM46A	A_23_P70660	-2.19
DKFZp667E0512	A_24_P282377	-3.76	ANAPC4	A_23_P317800	-2.18
ZDHHC11	A_23_P256008	-3.72	POLG2	A_23_P26905	-2.18
CCNL1	A_24_P337058	-3.65	PXN	A_23_P409355	-2.18
VPS13C	A_24_P927650	-3.61	MYO19	A_23_P320250	-2.17
PRR11	A_23_P207301	-3.56	IQSEC1	A_23_P6746	-2.17
SRSF11	A_23_P11664	-3.54	SFRS18	A_23_P122615	-2.16
DKFZP586I1420	A_23_P403398	-3.51	CYP1A2	A_23_P206110	-2.16
LOC150759	A_32_P122136	-3.44	LOC100190939	A_24_P110914	-2.15
NBPF14	A_23_P359430	-3.43	NOTCH2NL	A_32_P75695	-2.15
LOC441124	A_24_P456944	-3.42	TRIM56	A_23_P350107	-2.13
HMBOX1	A_23_P134684	-3.35	FLJ11710	A_23_P3921	-2.13
SP100	A_24_P916816	-3.35	AGAP7	A_32_P221958	-2.11
CCNL2	A_24_P51588	-3.35	ABCA5	A_23_P78018	-2.11
MBNL1	A_24_P925361	-3.31	AFG3L1	A_23_P404893	-2.09
RNF34	A_32_P70420	-3.29	CREBZF	A_23_P203645	-2.09
TNRC6C	A_23_P392501	-3.22	PCYOX1L	A_23_P30275	-2.08
ORC6L	A_23_P100341	-3.22	HECTD1	A_23_P54006	-2.07
NBPF3	A_23_P308189	-3.20	CROCCP2	A_23_P126486	-2.06
C5orf56	A_24_P829156	-3.17	ENOSF1	A_23_P15906	-2.06
KIDINS220	A_24_P7202	-3.15	MST1P9	A_32_P122373	-2.06
PHF20L1	A_23_P216038	-3.13	TNRC6A	A_23_P349310	-2.05
GOLGA8A	A_23_P37623	-3.12	LCOR	A_23_P429670	-2.05
ENGASE	A_23_P152583	-3.08	SMCHD1	A_23_P38723	-2.05
AMT	A_23_P257164	-3.01	VHL	A_23_P132611	-2.05
PDE7A	A_24_P360529	-3.01	TRIM33	A_23_P23526	-2.04
FUT6	A_23_P252664	-3.00	QKI	A_24_P456452	-2.03
CELF1	A_23_P63999	-3.00	TRIM44	A_23_P139297	-2.03
ANKFY1	A_24_P151834	-2.97	MED17	A_24_P941459	-2.02
C21orf96	A_24_P65941	-2.96	NBPF15	A_32_P27020	-2.01
PILRB	A_24_P403244	-2.95	EPM2AIP1	A_23_P415622	-2.00
DYNC1LI2	A_23_P9688	-2.93	TUBA1C	A_24_P188071	2.01
POU5F1	A_23_P59138	-2.90	LIME1	A_23_P376088	2.02
C1orf63	A_24_P2584	-2.88	C4orf42	A_23_P7087	2.04
KLF9	A_23_P415401	-2.86	AIRE	A_23_P68740	2.05
CHD2	A_24_P781846	-2.83	FAM50B	A_23_P8240	2.05
FLJ45340	A_32_P41375	-2.83	LOC644189	A_24_P152649	2.06
NBPF3	A_23_P103454	-2.81	B3GALT4	A_23_P111171	2.07

APÊNDICE A – Lista dos 221 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAC. O grupo CT apresentou 185 genes mais expressos e 36 genes menos expressos comparados com o grupo HAC (continuação).

Genes	Sondas	Fold Change	Genes	Sondas	Fold Change
NFKBIZ	A_23_P212089	-2.78	ANKRD35	A_23_P325690	2.08
MAPK8IP3	A_23_P218215	-2.77	SPN	A_23_P433758	2.08
FLJ45340	A_32_P24741	-2.76	IP6K2	A_23_P301138	2.08
GOLGA8A	A_32_P2392	-2.75	BIN1	A_32_P124125	2.08
CHD7	A_24_P58381	-2.72	B3GALT4	A_23_P422071	2.10
ZNF700	A_23_P27638	-2.72	NEFL	A_24_P18137	2.10
ZNF573	A_23_P339079	-2.67	NCRNA00116	A_24_P359295	2.11
TAF1C	A_23_P163546	-2.63	ZNF688	A_23_P141044	2.14
NLRP1	A_23_P107351	-2.62	LCP1	A_32_P181443	2.14
TARDBP	A_23_P403955	-2.61	HLA-L	A_24_P110012	2.22
TCF7	A_23_P7582	-2.61	LOC100129292	A_32_P177522	2.23
STAG3L1	A_32_P45894	-2.60	MAFA	A_24_P127719	2.23
SF3B1	A_32_P31633	-2.58	HN1	A_24_P247660	2.30
MGEA5	A_23_P202170	-2.58	LOC284889	A_32_P49334	2.42
CHD2	A_24_P264664	-2.55	CAMK2N2	A_23_P18406	2.54
C1orf63	A_23_P34396	-2.54	ACBD7	A_23_P72584	2.64
DMTF1	A_23_P8664	-2.54	ICA1	A_23_P215419	2.71
ARF1	A_24_P566891	-2.51	CPNE5	A_23_P360804	2.75
LOC390595	A_24_P481783	-2.51	CASP8	A_23_P209389	2.86
PILRB	A_23_P19829	-2.50	ZNF713	A_23_P74114	3.08
VPS13B	A_24_P280628	-2.50	TMEFF2	A_24_P239364	3.43
HNRNPA3	A_24_P706314	-2.50	ZNF2	A_23_P39223	3.47
FLJ45340	A_32_P50406	-2.50	PSPH	A_23_P251987	3.59
ZBED5	A_23_P98483	-2.49	FOXC2	A_24_P82358	3.96
BMS1	A_24_P615822	-2.49	SLC27A1	A_23_P131111	4.00
TRIM33	A_24_P34344	-2.49	GBP6	A_23_P130642	4.18
CSNK1A1	A_24_P316154	-2.48	POLR2J2	A_23_P215669	4.57
SNRK	A_24_P102151	-2.47	ASB16	A_23_P118581	4.62
RBBP6	A_23_P363206	-2.47	R3HDM2	A_23_P44631	5.35
MLXIP	A_23_P9823	-2.45			

APÊNDICE B – Lista dos 254 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAM/TSP. O grupo CT apresentou 171 genes mais expressos e 83 genes menos expressos comparados com o grupo HAM/TSP.

Genes	Sondas	Fold Change	Genes	Sondas	Fold Change
ILDR1	A_23_P109907	-10.75	MST1P9	A_32_P122373	-2.27
UBOX5	A_23_P218717	-9.50	PAPD7	A_23_P18824	-2.27
PXN	A_23_P13969	-8.17	CLN3	A_24_P567408	-2.26
ZBTB20	A_32_P179526	-7.78	LOC221442	A_24_P303420	-2.25
MALAT1	A_24_P497244	-6.93	LOC730144	A_24_P391960	-2.24
ALPK1	A_23_P144531	-6.78	DTNBP1	A_24_P145316	-2.24
DNAH3	A_23_P100522	-6.63	SPPL2B	A_23_P79066	-2.24
ZKSCAN1	A_23_P94063	-6.50	HNRNPA0	A_23_P252449	-2.23
PDE4C	A_23_P119583	-6.23	CYB5R3	A_24_P378958	-2.22
IKZF1	A_23_P124934	-6.14	IRF2BP2	A_24_P154214	-2.22
ORAI1	A_23_P150919	-6.04	ZNF283	A_24_P409670	-2.19
AHSA2	A_23_P372467	-6.01	HNRNPH1	A_32_P34149	-2.18
FRMD4A	A_24_P43959	-5.86	PPIAL4A	A_24_P144499	-2.16
GALNT3	A_23_P209459	-5.83	SUMO1P3	A_32_P223189	-2.15
LOC727820	A_32_P104619	-5.74	HIST1H3E	A_23_P70445	-2.15
PDZD7	A_23_P75097	-5.23	VPS13B	A_24_P280628	-2.15
ORC6L	A_23_P100341	-5.03	NBPF11	A_32_P149492	-2.15
MALAT1	A_24_P873659	-4.85	EEF1A1	A_32_P47701	-2.14
LOC441124	A_24_P456944	-4.82	SELL	A_23_P103522	-2.14
LOC150759	A_24_P391591	-4.43	NOTCH2NL	A_32_P75695	-2.13
RAX2	A_23_P56150	-4.40	IVNS1ABP	A_32_P205895	-2.13
PLXDC1	A_23_P3911	-4.38	LOC439951	A_24_P203953	-2.12
USP34	A_32_P81173	-4.32	CCNL2	A_23_P217899	-2.12
LENG8	A_24_P40055	-4.31	ANKHD1	A_23_P213326	-2.11
GGT6	A_23_P66774	-4.21	PHF10	A_24_P528213	-2.10
LOC338799	A_23_P116743	-4.16	NRBP2	A_23_P112883	-2.10
FBRSL1	A_24_P280497	-4.15	ANKRD11	A_23_P163639	-2.10
ZSCAN10	A_23_P15135	-4.06	POLI	A_23_P306890	-2.09
DKFZP434I0714	A_32_P160254	-4.03	CTNNB1	A_24_P608330	-2.09
RBBP6	A_23_P54781	-4.02	PION	A_23_P416894	-2.08
SOX8	A_24_P65292	-4.01	LOC642826	A_32_P124493	-2.08
CLK3	A_32_P20691	-3.98	LOC339352	A_24_P542291	-2.08
LRP3	A_23_P16415	-3.98	SIK1	A_24_P237231	-2.08
SDCBP	A_23_P168974	-3.92	C18orf23	A_24_P348083	-2.07
XPO6	A_23_P206822	-3.90	TRIM66	A_32_P396186	-2.07
GOLGA8F	A_24_P384588	-3.90	ZMIZ2	A_24_P29686	-2.05
FUT6	A_23_P252664	-3.90	BTN2A1	A_23_P501634	-2.05
LMF1	A_24_P367812	-3.89	COX11	A_24_P391531	-2.04
IRX3	A_24_P207195	-3.83	SBDS	A_32_P177024	-2.04
LOC100131582	A_24_P848662	-3.82	KLHL3	A_23_P133543	-2.04
PRR11	A_23_P207301	-3.82	STMN3	A_23_P165927	-2.03

APÊNDICE B – Lista dos 254 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAM/TSP. O grupo CT apresentou 171 genes mais expressos e 83 genes menos expressos comparados com o grupo HAM/TSP (continuação).

Gene	Sondas	Fold Change	Genes	Sondas	Fold Change
SYNPO	A_24_P405992	-3.78	PAN3	A_23_P385938	-2.03
TRIM35	A_24_P12651	-3.76	RAI1	A_23_P417144	-2.03
SEC31B	A_23_P35564	-3.71	ZNF862	A_24_P333421	-2.02
HNRNPA1L2	A_24_P32849	-3.63	COMT	A_23_P251680	2.01
PSORS1C2	A_24_P166434	-3.58	S100A4	A_23_P94800	2.01
UBE3A	A_32_P45375	-3.58	PSMD8	A_23_P67466	2.01
MYO1C	A_23_P164022	-3.56	ADRM1	A_24_P305597	2.01
PIP5K1C	A_23_P78952	-3.49	ST6GALNAC1	A_23_P54968	2.01
SPSB4	A_23_P258381	-3.46	SIL1	A_23_P252903	2.02
SUMO2	A_32_P228869	-3.43	PKM2	A_32_P147241	2.02
HNRNPA1	A_24_P517901	-3.32	EIF6	A_23_P210939	2.03
AGAP7	A_32_P221958	-3.25	FIBP	A_23_P13018	2.03
DDX17	A_24_P925611	-3.15	ZDHHC24	A_24_P259276	2.03
PCSK5	A_23_P257003	-3.13	MCM5	A_23_P132277	2.03
STAG3L1	A_32_P45894	-3.05	FLOT2	A_23_P55319	2.04
IER5	A_24_P379223	-3.04	HN1	A_24_P247660	2.04
CBX7	A_32_P203585	-3.02	COX8A	A_23_P52639	2.04
CRHR2	A_24_P926058	-2.99	LOC284889	A_32_P49334	2.04
CMIP	A_23_P100263	-2.97	ACP5	A_23_P142075	2.05
NEUROG1	A_24_P269101	-2.97	TLR1	A_23_P10873	2.06
NBPF14	A_23_P359430	-2.95	SLC25A1	A_23_P120776	2.07
FKSG2	A_23_P255827	-2.94	UQCRC1	A_23_P132675	2.08
NACAP1	A_23_P59888	-2.93	ILK	A_23_P105066	2.08
NLRP1	A_23_P107351	-2.92	PAFAH1B3	A_23_P16078	2.08
C19orf6	A_23_P90369	-2.91	ELOVL1	A_23_P23380	2.08
ANKFY1	A_24_P151834	-2.89	MEA1	A_23_P30745	2.09
HSD17B1	A_24_P230502	-2.87	SPSB2	A_23_P151098	2.10
POU5F1	A_23_P59138	-2.86	TMEM120A	A_23_P259632	2.10
SP100	A_24_P916816	-2.86	CD63	A_24_P270144	2.11
ST13P2	A_24_P24912	-2.85	FAM176B	A_23_P62831	2.11
RHBDL1	A_23_P26468	-2.84	ALDH16A1	A_24_P5743	2.11
CHD2	A_24_P781846	-2.83	ANXA2	A_32_P94798	2.13
ENGASE	A_23_P152583	-2.81	CCDC85B	A_23_P150249	2.13
GOLGA8A	A_32_P2392	-2.81	HN1	A_23_P100632	2.13
SF3A2	A_23_P90339	-2.80	GCHFR	A_23_P77328	2.14
ZBED5	A_24_P920319	-2.78	GSTK1	A_23_P20107	2.15
PDE7A	A_24_P360529	-2.76	ALDOA	A_23_P88963	2.15
ZNF700	A_23_P27638	-2.74	MCM2	A_32_P103633	2.16
LOC100130890	A_24_P456884	-2.73	PRDX5	A_23_P12989	2.17
RIC3	A_23_P75915	-2.68	CDK2AP2	A_23_P104579	2.18

APÊNDICE B – Lista dos 254 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAM/TSP. O grupo CT apresentou 171 genes mais expressos e 83 genes menos expressos comparados com o grupo HAM/TSP (continuação).

Genes	Sondas	Fold Change	Genes	Sondas	Fold Change
UCN2	A_23_P155453	-2.66	TSSC4	A_23_P2026	2.18
KIDINS220	A_24_P7202	-2.66	NTHL1	A_23_P88904	2.19
AMT	A_23_P257164	-2.64	MPND	A_23_P130886	2.21
SRP9	A_32_P165340	-2.63	DCTPP1	A_23_P33613	2.24
MYPOP	A_24_P392486	-2.63	VAMP5	A_23_P39840	2.25
MAPK8IP3	A_23_P218215	-2.62	RHOC	A_23_P12514	2.25
CROCCP2	A_23_P126486	-2.61	ALOX5AP	A_24_P347378	2.25
LOC400061	A_24_P92973	-2.59	CAPNS1	A_23_P67648	2.26
AGAP3	A_24_P333364	-2.59	PCBP4	A_23_P166807	2.27
SET	A_24_P917866	-2.57	HINT2	A_23_P157784	2.29
NBPF3	A_23_P308189	-2.57	SIT1	A_23_P43369	2.29
RPAIN	A_24_P307785	-2.55	LIME1	A_23_P376088	2.31
TNRC6C	A_23_P392501	-2.54	CD63	A_23_P139476	2.31
NBPF3	A_23_P103454	-2.54	MPG	A_24_P48162	2.32
LYNX1	A_23_P257672	-2.52	OASL	A_23_P139786	2.34
CHD2	A_24_P264664	-2.51	MAPKAPK3	A_23_P314584	2.37
ZNF714	A_24_P19268	-2.51	PRELID1	A_23_P79161	2.37
EIF5	A_24_P398810	-2.50	GIYD1	A_23_P501451	2.38
EEF1A1	A_32_P44316	-2.50	CKS2	A_23_P71727	2.38
LOC390595	A_24_P481783	-2.48	ANKRD35	A_23_P325690	2.38
BMS1	A_24_P615822	-2.48	AHNAK	A_23_P21363	2.38
CHD7	A_32_P150012	-2.47	S100P	A_23_P58266	2.42
MORF4	A_24_P3461	-2.47	BLOC1S1	A_23_P53298	2.42
PDXDC2P	A_32_P216872	-2.45	ZNF688	A_23_P141044	2.42
PHF10	A_23_P503200	-2.45	CD320	A_23_P119698	2.54
HIST1H3B	A_24_P174924	-2.44	GSDMD	A_23_P112103	2.54
LOC100132167	A_32_P74357	-2.44	IL32	A_23_P15146	2.57
DKFZp434F142	A_23_P111797	-2.41	COPE	A_23_P209088	2.62
SPEG	A_23_P338919	-2.40	UBE2S	A_32_P184933	2.64
SRP14P1	A_24_P255314	-2.40	PI16	A_24_P300379	2.64
RSRC2	A_24_P350160	-2.39	PDCD1	A_23_P136405	2.65
SFRS18	A_23_P122615	-2.39	ANXA2	A_23_P146644	2.68
TRA2A	A_24_P929807	-2.38	LCP1	A_32_P181443	2.70
NBPF15	A_32_P27020	-2.36	BFSP1	A_23_P109171	2.72
BHLHE23	A_24_P57898	-2.36	MED16	A_23_P56170	2.72
ANKRD11	A_32_P82403	-2.35	CST7	A_23_P68601	2.80
TBC1D3F	A_23_P164210	-2.35	CDKN2A	A_23_P43490	2.82
SNRK	A_24_P102151	-2.34	IGHM	A_24_P417352	2.83
FAN1	A_23_P377888	-2.34	NCR3	A_23_P251881	2.85
STX16	A_24_P936122	-2.32	MYO1G	A_24_P206343	3.02

APÊNDICE B – Lista dos 254 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAM/TSP. O grupo CT apresentou 171 genes mais expressos e 83 genes menos expressos comparados com o grupo HAM/TSP (continuação).

Genes	Sondas	<i>Fold Change</i>	Genes	Sondas	<i>Fold Change</i>
ABCA5	A_24_P67096	-2.32	MYO1G	A_23_P257542	3.13
JMJD7-PLA2G4B	A_23_P403424	-2.31	JAKMIP1	A_23_P144274	3.43
FLJ45340	A_32_P50406	-2.30	CPNE5	A_23_P360804	3.44
LPHN1	A_23_P208551	-2.30	IGK@	A_32_P39440	3.55
AGAP1	A_32_P55161	-2.29	LGALS1	A_23_P166459	3.98
EGFL8	A_23_P424582	-2.28	CLU	A_23_P215913	4.18

APÊNDICE C – Lista dos 70 genes diferencialmente expressos na comparação HAM/TSP vs. HAC. O grupo HAC apresentou 68 genes mais expressos e 2 genes menos expressos comparados com o grupo HAM/TSP.

Genes	Sondas	Fold Change	Genes	Sondas	Fold Change
LEPROT	A_23_P1126	-2.04	HIST1H3B	A_24_P174924	2.66
P2RX7	A_23_P25354	-2.01	CNO	A_23_P69670	2.75
NAP1L1	A_32_P82409	2.00	PPIAL4A	A_24_P264772	2.77
RHO	A_23_P57950	2.01	LOC100131582	A_24_P848662	2.79
SUMO1P3	A_32_P223189	2.02	ITM2B	A_24_P381604	2.86
LOC730144	A_24_P391960	2.04	MORF4	A_24_P3461	2.94
PTGES3	A_32_P114896	2.04	LOC400061	A_24_P92973	3.02
ATP5E	A_32_P123771	2.05	KRTAP1-3	A_24_P142495	3.07
NACC1	A_24_P271285	2.07	PPIAL4A	A_24_P144499	3.12
RSRC2	A_24_P350160	2.07	CRCT1	A_24_P191047	3.24
COX5A	A_32_P98502	2.07	C1orf152	A_23_P350059	3.30
HRASLS5	A_23_P416314	2.07	HNRNPA1L2	A_24_P32849	3.31
ANKRD2	A_24_P188116	2.08	LCE2D	A_23_P371284	3.31
DICER1	A_32_P129689	2.09	FKSG2	A_23_P255827	3.42
CAPZA2	A_32_P224666	2.09	HIST1H3I	A_24_P9321	3.45
POU3F3	A_24_P34575	2.10	SRP14P1	A_24_P255314	3.48
BHLHE23	A_24_P57898	2.11	SRP9	A_32_P165340	3.65
LOC728003	A_24_P727868	2.11	LOC100131138	A_32_P211248	3.74
DGKH	A_24_P220575	2.16	GPT	A_23_P146339	3.77
BTN2A1	A_23_P501634	2.16	CLK3	A_32_P20691	3.90
SP5	A_32_P74615	2.17	HNRNPA1	A_24_P517901	3.91
CYP4F2	A_24_P168494	2.18	XPO6	A_23_P206822	3.94
TCP1P3	A_24_P307184	2.19	GFAP	A_24_P31165	4.21
OSTCL	A_24_P317450	2.19	KRTAP5-8	A_23_P47086	4.39
SF3A1	A_24_P250614	2.23	SUMO2	A_32_P228869	4.70
COX11	A_24_P391531	2.25	NACAP1	A_23_P59888	4.71
SCRT2	A_24_P117782	2.33	SET	A_24_P917866	4.75
TRIM35	A_24_P12651	2.35	MAB21L2	A_24_P148907	5.05
EFCAB4A	A_23_P432545	2.39	DIRC1	A_23_P131139	5.12
TMEFF2	A_24_P239364	2.41	LOC100130890	A_24_P456884	5.20
SUMO2	A_32_P149536	2.42	IL27	A_23_P315320	5.24
LOC285830	A_32_P76811	2.45	PRSS36	A_24_P412734	5.28
SAMD10	A_23_P427616	2.46	MCAT	A_24_P237328	5.39
HIST1H3E	A_23_P70445	2.57	C6orf124	A_32_P334340	5.50
ST13P2	A_24_P24912	2.59	PABPC3	A_23_P48307	5.57

APÊNDICE D – Lista dos 86 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAC com CT vs. HAM/TSP.

Genes	Sondas	Fold Change CT vs. HAC	Fold Change CT vs. HAM/TSP
ABCA5	A_24_P67096	-2.36	-2.32
AGAP1	A_32_P55161	-2.43	-2.29
AGAP7	A_32_P221958	-2.11	-3.25
AHSA2	A_23_P372467	-5.88	-6.01
ALPK1	A_23_P144531	-5.07	-6.78
AMT	A_23_P257164	-3.01	-2.64
ANKFY1	A_24_P151834	-2.97	-2.89
ANKRD35	A_23_P325690	2.08	2.38
BMS1	A_24_P615822	-2.49	-2.48
CCNL2	A_23_P217899	-2.32	-2.12
CHD2	A_24_P781846	-2.83	-2.83
CHD2	A_24_P264664	-2.55	-2.51
CHD7	A_24_P58381	-2.72	-2.47
CPNE5	A_23_P360804	2.75	3.44
CROCCP2	A_23_P126486	-2.06	-2.61
CTNNB1	A_24_P608330	-2.20	-2.09
DKFZp434F142	A_23_P111797	-2.42	-2.41
EGFL8	A_23_P424582	-2.37	-2.28
EIF5	A_24_P398810	-2.19	-2.50
ENGASE	A_23_P152583	-3.08	-2.81
FAN1	A_23_P377888	-2.40	-2.34
FLJ45340	A_32_P50406	-2.50	-2.30
FUT6	A_23_P252664	-3.00	-3.90
GALNT3	A_23_P209459	-3.86	-5.83
GGT6	A_23_P66774	-4.53	-4.21
GOLGA8A	A_32_P2392	-2.75	-2.81
GOLGA8F	A_24_P384588	-3.77	-3.90
HN1	A_24_P247660	2.30	2.04
IKZF1	A_23_P124934	-8.05	-6.14
ILDR1	A_23_P109907	-6.80	-10.75
IVNS1ABP	A_32_P205895	-2.33	-2.13
JMJD7-PLA2G4B	A_23_P403424	-2.23	-2.31
KIDINS220	A_24_P7202	-3.15	-2.66
LCP1	A_32_P181443	2.14	2.70
LENG8	A_24_P40055	-5.14	-4.31
LIME1	A_23_P376088	2.02	2.31
LOC150759	A_24_P391591	-4.65	-4.43
LOC221442	A_24_P303420	-2.32	-2.25
LOC284889	A_32_P49334	2.42	2.04
LOC338799	A_23_P116743	-4.13	-4.16
LOC390595	A_24_P481783	-2.51	-2.48

APÊNDICE D – Lista dos 86 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAC com CT vs. HAM/TSP (continuação).

Genes	Sondas	Fold Change CT vs. HAC	Fold Change CT vs. HAM/TSP
LOC441124	A_24_P456944	-3.42	-4.82
LOC642826	A_32_P124493	-2.25	-2.08
LOC727820	A_32_P104619	-7.00	-5.74
LPHN1	A_23_P208551	-2.22	-2.30
MALAT1	A_24_P497244	-8.29	-6.93
MALAT1	A_24_P873659	-5.34	-4.85
MAPK8IP3	A_23_P218215	-2.77	-2.62
MST1P9	A_32_P122373	-2.06	-2.27
MYO1C	A_23_P164022	-4.18	-3.56
NBPF14	A_23_P359430	-3.43	-2.95
NBPF15	A_32_P27020	-2.01	-2.36
NBPF3	A_23_P308189	-3.20	-2.57
NBPF3	A_23_P103454	-2.81	-2.54
NLRP1	A_23_P107351	-2.62	-2.92
NOTCH2NL	A_32_P75695	-2.15	-2.13
ORA1	A_23_P150919	-6.17	-6.04
ORC6L	A_23_P100341	-3.22	-5.03
PAPD7	A_23_P18824	-2.27	-2.27
PDE4C	A_23_P119583	-4.03	-6.23
PDE7A	A_24_P360529	-3.01	-2.76
PDZD7	A_23_P75097	-5.51	-5.23
PION	A_23_P416894	-2.39	-2.08
PLXDC1	A_23_P3911	-4.17	-4.38
POU5F1	A_23_P59138	-2.90	-2.86
PRR11	A_23_P207301	-3.56	-3.82
PXN	A_23_P13969	-5.12	-8.17
RAX2	A_23_P56150	-4.64	-4.40
RBBP6	A_23_P54781	-5.00	-4.02
RPAIN	A_24_P307785	-2.37	-2.55
SDCBP	A_23_P168974	-4.40	-3.92
SFRS18	A_23_P122615	-2.16	-2.39
SNRK	A_24_P102151	-2.47	-2.34
SP100	A_24_P916816	-3.35	-2.86
SPSB4	A_23_P258381	-2.35	-3.46
STAG3L1	A_32_P45894	-2.60	-3.05
TBC1D3F	A_23_P164210	-2.44	-2.35
TNRC6C	A_23_P392501	-3.22	-2.54
TRA2A	A_24_P929807	-2.28	-2.38
UBOX5	A_23_P218717	-6.21	-9.50
USP34	A_32_P81173	-5.48	-4.32

APÊNDICE D – Lista dos 86 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAC com CT vs. HAM/TSP (continuação).

Genes	Sondas	<i>Fold Change</i> CT vs. HAC	<i>Fold Change</i> CT vs. HAM/TSP
VPS13B	A_24_P280628	-2.50	-2.15
ZBTB20	A_32_P179526	-8.38	-7.78
ZKSCAN1	A_23_P94063	-4.71	-6.50
ZNF688	A_23_P141044	2.14	2.42
ZNF700	A_23_P27638	-2.72	-2.74

APÊNDICE E – Lista dos 25 genes diferencialmente expressos na comparação CT vs. HAM/TSP com HAM/TSP vs. HAC.

Genes	Sondas	Fold Change CT vs. HAM/TSP	Fold Change HAM/TSP vs. HAC
BHLHE23	A_24_P57898	-2.36	2.11
BTN2A1	A_23_P501634	-2.05	2.16
CLK3	A_32_P20691	-3.98	3.90
COX11	A_24_P391531	-2.04	2.25
FKSG2	A_23_P255827	-2.94	3.42
HIST1H3B	A_24_P174924	-2.44	2.66
HIST1H3E	A_23_P70445	-2.15	2.57
HNRNPA1	A_24_P517901	-3.32	3.91
HNRNPA1L2	A_24_P32849	-3.63	3.31
LOC100130890	A_24_P456884	-2.73	5.20
LOC100131582	A_24_P848662	-3.82	2.79
LOC400061	A_24_P92973	-2.59	3.02
LOC730144	A_24_P391960	-2.24	2.04
MORF4	A_24_P3461	-2.47	2.94
NACAP1	A_23_P59888	-2.93	4.71
PPIAL4A	A_24_P144499	-2.16	3.12
RSRC2	A_24_P350160	-2.39	2.07
SET	A_24_P917866	-2.57	4.75
SRP14P1	A_24_P255314	-2.40	3.48
SRP9	A_32_P165340	-2.63	3.65
ST13P2	A_24_P24912	-2.85	2.59
SUMO1P3	A_32_P223189	-2.15	2.02
SUMO2	A_32_P228869	-3.43	4.70
TRIM35	A_24_P12651	-3.76	2.35
XPO6	A_23_P206822	-3.90	3.94

APÊNDICE F – Gene diferencialmente expresso na comparação CT vs. HAC com HAM/TSP vs. HAC.

Genes	Sondas	<i>Fold Change</i> CT vs. HAC	<i>Fold Change</i> HAM/TSP vs.HAC
TMEFF2	A_24_P239364	3.43	2.41

APÊNDICE G – Comparação dos genes diferencialmente expressos entre grupos CT, HAC e HAM/TSP.

	<i>IL-27</i>	<i>CXCR4</i>	<i>PXN</i>	<i>PRF1</i>	<i>GZMB</i>	<i>GZMA</i>	<i>Foxp3</i>
CT vs. HAC	p=0,0002	p=0,0504	p=0,0913	p=0,0168	p=0,3745	p=0,4692	p=0,2679
CT vs. HAM/TSP	p=0,1607	p=0,2404	p=0,0002	p<0,0001	p=0,2326	p=0,0038	p=0,0003
HAC vs. HAM/TSP	p=0,0392	p=0,0305	p=0,0059	p=0,0037	p=0,3559	p=0,0071	p=0,0016

p= *p* valores obtidos nas análises estatísticas quando comparados os valores de expressão gênica entre os grupos: controle (CT), assintomático (HAC) e HAM/TSP. Foi aplicado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, unicaudal. vs.: versus.

Anexos



ANEXOS

ANEXO I - Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa



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

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 23 de maio de 2007

Ofício nº 1709/2007
CEP/SPC

Prezada Doutora,

O trabalho intitulado "**ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM LINFÓCITOS T CD4⁺ E CD8⁺ ISOLADOS DE PACIENTES INFECTADOS PELO HTLV-1**", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 247^a Reunião Ordinária realizada em 21/05/2007, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 3083/2007.

Atenciosamente.


PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora
DR^a SIMONE KASHIMA HADDAD
TATHIANE MAISTRO MALTA (Aluna)
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

ANEXO II – Termo de consentimento livre e esclarecido dos controles

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: “Análise do Perfil de Expressão Gênica em Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ isolados de pacientes infectados pelo HTLV-1”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Simone Kashima Haddad/Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que é desenvolvida pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP-RP, em conjunto com os pesquisadores do Centro de Terapia Celular - Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV).

A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento. Caso não queira participar, o seu seguimento no ambulatório continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu tratamento.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) é um vírus que pode ser transmitido pelo sangue, contato sexual e da mãe grávida para o filho. Este vírus pode levar a uma doença com alteração nos nervos ou no sangue. Esta pesquisa trará benefícios para o entendimento de como o vírus se comporta e promove o aparecimento de doenças.

Para a realização deste trabalho, precisamos da colheita de sangue de pessoas que **NÃO** estejam contaminadas com este vírus. Será importante para utilizar como controle **negativo** para esta pesquisa. A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 20 mL de sangue. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. A colheita de sangue será realizada no braço, com seringas e agulhas descartáveis por um profissional capacitado, semelhante à picada de um exame de sangue. Este trabalho trará benefícios

para o entendimento de como o vírus se comporta e promove o aparecimento desta infecção nos portadores.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Afirmamos que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. Esta pesquisa não trará benefício direto ao sujeito envolvido, ficando a critério do mesmo a desistência em participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ao seu seguimento hospitalar.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Rochele Azevedo/Tathiane Malta ou Simone Kashima Haddad pelo telefone (16) 2101 9300 ramal 9606.

Eu, _____

RG nº: _____, autorizo a retirada de 20 mL do meu sangue através de punção venosa para a realização de pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a minha saúde. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é de entender como o vírus se comporta e promove o aparecimento das infecções.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 200__.

Assinatura do paciente – Registro

Simone K.Haddad/ Prof. Dr. Dimas T. Covas
Pesquisadores Responsáveis

ANEXO III – Termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: “Análise do Perfil de Expressão Gênica em Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ isolados de pacientes infectados pelo HTLV-1”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Simone Kashima Haddad
Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Gostaríamos de convidá-lo a participar deste projeto de pesquisa. Este projeto faz parte de uma linha de pesquisa que é desenvolvida pelo corpo clínico do Hospital das Clínicas da FMRP-USP-RP, em conjunto com os pesquisadores do Centro de Terapia Celular - Centro Regional de Hemoterapia do HC-FMRP-USP, com o objetivo de conhecer melhor o vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV).

A sua participação é **voluntária**. Para participar, é necessário ler atentamente este documento e ouvir nossas explicações em caso de dúvidas. Se estiver interessado em participar, solicitaremos que assine este documento. Caso não queira participar, o seu seguimento no ambulatório continuará o mesmo, sem prejuízo nenhum para o seu tratamento.

O que é HTLV?

Esta sigla significa vírus linfotrópico de células T humanas.

Como ele é transmitido?

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) é um vírus que pode ser transmitido pelo sangue, contato sexual e da mãe grávida para o filho.

O que ele causa?

A grande maioria dos indivíduos não apresenta sintomas, porém uma pequena parcela das pessoas infectadas pode ter uma doença com alteração nos nervos ou no sangue.

Como você, paciente, vai participar da pesquisa?

A pessoa que participar desta pesquisa deverá doar 40 mL de sangue. Esta quantidade de sangue retirada não será prejudicial à saúde. A colheita de sangue será realizada no braço, após a assepsia, com seringas e agulhas descartáveis e por um profissional capacitado,

podendo levar a um leve desconforto passageiro. Os riscos que podem ocorrer são a formação de hematomas no local da punção (acúmulo de sangue debaixo da pele) e sensação dolorosa.

Porque esta pesquisa está sendo feita?

Esta pesquisa trará benefícios para o entendimento de como o vírus se comporta e promove o aparecimento de doenças.

Não haverá nenhuma despesa e nenhum ganho em dinheiro. Afirmamos que os nomes dos participantes não serão divulgados em nenhum momento. Esta pesquisa não trará benefício direto ao sujeito envolvido, ficando a critério do mesmo a desistência em participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo ao seu seguimento hospitalar.

Qualquer dúvida sobre esta pesquisa, entrar em contato com Rochele Azevedo/Tathiane Malta ou Simone Kashima Haddad pelo telefone (16) 2101 9300 ramal 9606.

Eu, _____

RG nº: _____, autorizo a retirada de 40 mL do meu sangue através de punção venosa para a realização de pesquisa. Fui informado (a) sobre o procedimento e que o volume retirado não causará dano a minha saúde. Fui informado (a) também que a finalidade dessa pesquisa é de entender como o vírus se comporta e promove o aparecimento das infecções.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 200__.

Assinatura do paciente – Registro

Simone K.Haddad/ Prof. Dr. Dimas T. Covas
Pesquisadores Responsáveis