UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Estudo funcional de microRNAs na infecção pelo HTLV-1

Kátia Kaori Otaguiri

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Estudo funcional de microRNAs na infecção pelo HTLV-1

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

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia

Orientada: Katia Kaori Otaguiri

Orientadora: Prof. Dra. Simone Kashima
Haddad

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 15/03/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2013

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

Otaguiri, Karia Kaori

Estudo funcional de microRNAs na infecção pelo HTLV-1, 2013.

103 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 Linfócito T CD4⁺. 4. microRNAs

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Katia Kaori Otaguiri

Título do trabalho: Estudo funcional de microRNAs na infecção pelo HTLV-1

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

*Aos meus pais, Alberto e Denise, por serem a
minha maior inspiração em tudo que faço.*

*Ao meu namorado e melhor amigo, Sante, por
sempre estar ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

A gratidão é um dos sentimentos mais nobres do ser humano. Este espaço é um dos raros momentos que este sentimento pode ser trabalhado para poder expressar o que as palavras ditas não conseguem proferir. Muitos são os obrigados e poucas as palavras.

À **Deus**, pelo dom da vida e por plantar sempre a sementinha da fé.

À minha orientadora **Prof. Dra. Simone Kashima Haddad** pela oportunidade e confiança a mim depositada. Por ser um exemplo de que força de vontade e perseverança são caminhos que chegam aos mais gloriosos destinos.

Aos **pacientes deste estudo**, que gentilmente doaram as amostras utilizadas nos experimentos. Obrigada por serem espelhos de esperança e alegria.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pela bolsa de mestrado concedida para o desenvolvimento deste projeto.

Ao **Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas** e à **Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto** pela oportunidade e viabilização de todos os experimentos

Ao Laboratório de **Clonagem e Expressão Gênica**, em especial à Anemari Ramos Dinarte pelos valiosos conselhos, empréstimos e amizade, e à Adriana Aparecida Marquez pela disponibilidade infundável nas reações de sequenciamento.

Ao **Laboratório de Citometria de Fluxo**. À Patrícia Vianna Bonini pela paciência e pelos ensinamentos, à Camila Cristina de Oliveira Menezes e Daiani F. dos Santos pelas valiosas contribuições e disponibilidade em realizar os experimentos.

Ao **Laboratório de Hematologia** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial à Luciana Ambrósio pela paciência, ensinamentos e contribuição no desenvolvimento da metodologia de *Western Blotting* utilizada neste trabalho.

Ao **Laboratório de Química de Proteínas**, em especial à Carolina Hassibe Thomé pelo auxílio na revelação das membranas de *Western Blotting*.

Às secretárias **Carmem Cecília de Oliva Simão** pela estimado auxílio, e **Dalva Tereza Catto** pelo carinho e abraço de sempre.

À **Seção de Pós-Graduação** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, em especial ao secretário Henrique Theodoro pela disponibilidade, apoio e auxílio, e pela extrema dedicação e competência.

Aos meus professores da graduação: **Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura**, por ser meu mentor e principal exemplo e motivador à pesquisa, meus sinceros agradecimentos e mais profunda admiração; e **Prof. Dr. Auro Nomizo**, pela amizade e por

compartilhar a paixão por novos conhecimentos. Obrigada por me iniciarem ao mundo da pesquisa científica.

Aos meus querido amigos do Laboratório de Biologia Molecular, Aline, Evandra, Mariana, Mauricio, Mayra, Slav, Tathiane, Virginia e Fernanda, sem esquecer dos “para sempre BioMol” Maria Fernanda e Turquinho, por todo o apoio e valiosas contribuições científicas durante este tempo. Obrigada principalmente pelas conversas, risadas e adorável convivência.

A minha mais profunda gratidão

Aos meus pais, **Alberto e Denise**, que em todos esses anos me ensinaram a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Obrigada pelo maior exemplo de amor e união, pelo carinho, apoio e paciência durante todos esses anos e, principalmente, por sempre acreditarem em mim. E obrigada por me darem os melhores irmãos.

Ao meu namorado, companheiro e acima de tudo amigo, **Sante**, por me entender e sempre me apoiar em todas as decisões. Obrigada ainda por respeitar meu silêncio e compartilhar meus sorrisos. E obrigada por sempre me acompanhar ao laboratório quando os experimentos iam até altas horas.

A **toda minha família** que sempre acreditaram e se orgulharam de mim. Espero nunca decepcioná-los.

Aos meus queridos amigos **Tuka, Buda, Saddam e Kenji** por, apesar de longe, sempre estarem comigo de uma forma ou de outra. Obrigada pela confiança, pelo respeito e pela sólida amizade, que espero que dure por longos anos.

Aos meus grandes amigos: **Funério e Xis**, por anos de sincera amizade e serem grandes exemplos de inteligência, dedicação e companheirismo. **Paula Tej**, pela amizade, carinho e torcida, *tu é mi amor*. **Paty**, minha irmãzinha, por todo o carinho, ajuda e por sempre se lembrar de mim. **E Paula Dias**, por sempre aparecer e deixar meus dias mais alegres.

O maior perigo que se coloca para o agradecimento seletivo não é decidir quem incluir, mas decidir quem não mencionar. Então, a meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha mais profunda gratidão.

***“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima.”***

Louis Pasteur

RESUMO

OTAGUIRI, K.K. Estudo funcional de microRNAs na infecção pelo HTLV-1. 2013. 103f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus descrito e está etiológicamente ligado a duas principais doenças: a leucemia/linfoma de célula T do adulto (ATLL) e a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Apenas 0,3 a 5% dos indivíduos infectados desenvolvem essas doenças associadas, 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. Atualmente, uma abordagem promissora no entendimento de mecanismos, bem como na fisiopatogênese das infecções virais tem sido a avaliação da função de microRNAs (miRNAs). Há poucos dados na literatura envolvendo estas moléculas na infecção pelo HTLV-1 em linfócitos T CD4⁺ bem como no estabelecimento da doença HAM/TSP. No presente estudo, foi avaliada a expressão de miRNAs dos linfócitos T CD4⁺ isolados de portadores sem HAM/TSP (HAC), pacientes HAM/TSP e indivíduos saudáveis (CT) por meio de PCR em tempo real. A análise do perfil de expressão dos miRNAs nessas células revelou que 56 e 10 miRNAs apresentavam-se mais 1,5 vezes aumentados no grupo HAM/TSP e HAC, respectivamente. O miR-125b-1-1 apresentou expressão significativamente maior no grupo HAC e o miR-146a, no grupo HAM/TSP. A análise *in silico* de predição de alvo demonstrou que o gene *IFNG* era potencialmente alvo do miR-125b-1-1 e os genes *IRAK1* e *TRAF6* do miR-146a. Foi demonstrado que a expressão do *IFNG* no grupo HAC era 1,3 vezes mais elevada que o grupo CT e 1,8 vezes mais elevada no grupo HAM que no grupo CT. Houve um aumento na expressão de *TRAF6* de 15,7 e 1,5 vezes nos grupos HAM/TSP e HAC, respectivamente. Não foi observada diferença na expressão de *IRAK1* entre os três grupos. O ensaio de superexpressão do miR-125b-1-1 alterou a expressão do *IFNG* e do miR-146a alterou a expressão do gene *IRAK1* e sua proteína. Os resultados evidenciados neste trabalho ressaltam a importância dos miRNAs na modulação de genes e proteínas importantes durante a infecção pelo HTLV-1. A correlação entre o miR-125b-1-1 e gene *IFNG* sugere que este miRNA esteja envolvido nos mecanismos de desenvolvimento de HAM/TSP. Além disso, a interação entre o miR-146a e os genes *IRAK1* e *TRAF6* sugerem que este miRNA esteja relacionado a mecanismos de persistência viral da infecção pelo HTLV-1 em linfócitos T CD4⁺.

Palavras-chave: HTLV-1; HAM/TSP; Linfócito T CD4⁺; microRNAs.

ABSTRACT

OTAGUIRI, K.K. miRNAs functional study in HTLV-1 infection. 2013. 103f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) was the first human retrovirus discovered and it is related with two major diseases: adult T cell lymphoma/leukaemia (ATLL) and HTLV-1 –associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). About 0.3 to 5% of infected individuals will develop HTLV-1 related diseases, while the majority will remain 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. Currently, a promising approach on understanding the mechanisms as well as pathogenesis of viral infections has been the evaluation of the role of microRNAs (miRNAs) roles. There are few data involving CD4⁺ T cells miRNA expression in HTLV-1 infection as well as HAM/TSP establishment. To identify miRNAs differentially expressed in CD4⁺ T cells among non-infected individuals (CT), asymptomatic (HAC) and HAM/TSP patients we applied quantitative real time PCR. The analysis of miRNA expression profile in these cells showed 56 and 10 miRNAs upregulated 1.5 times in HAM/TSP and HAC groups, respectively. miR-125b-1-1 was upregulated in HAC group and miR-146a in HAM/TSP. In silico analysis of target prediction showed that *IFNG* was a potentially miR-125b-1-1 target and *IRAK1* and *TRAF6* were miR-146a targets. *IFNG* expression was 1.3 higher in HAC than CT group and 1.8 higher in HAM/TSP than CT group. It was observed that *TRAF6* expression was 15.7 and 1.5 times higher in HAM/TSP and HAC groups, respectively. There was no difference of *IRAK1* expression among the three groups. Overexpression assays of miR-125b-1-1 altered *IFNG* expression and overexpression of miR-146a altered *IRAK1* gene and protein expression. The results revealed that miRNAs modulate genes and proteins during HTLV-1 infection. miR-125b-1-1 and *IFNG* gene correlation suggests that miR-125b-1-1 seems to contribute to HAM/TSP development. Besides, miR-146a and *IRAK1* and *TRAF6* interaction suggests that miR-146a seems to contribute to HTLV-1 establishment in CD4⁺ T cells.

Keywords: HTLV-1; HAM/TSP; CD4⁺ T cells; microRNAs.

RESUMEN

OTAGUIRI, K.K. Estudio funcional de microRNAs en la infección por HTLV-1. 2013. 103 h. Disertación de Maestría. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

El virus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1) fue el primer retrovirus descrito y está etiológicamente relacionado a dos enfermedades: la leucemia/linfoma de célula T del adulto (ATLL) y la mielopatía asociada al HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Solo el 0,3 al 5% de los individuos infectados desarrollan esas enfermedades asociadas, mientras la mayoría permanece asintomática. La HAM/TSP es una manifestación inflamatoria del sistema nervioso central y el mecanismo por lo cual el HTLV-1 induce el surgimiento de HAM/TSP, todavía no totalmente aclarado. Actualmente, una propuesta promisoría en el entendimiento de mecanismos, como en la fisiopatogenénesis de las infecciones virales, es la evaluación de la función de microRNAs (miRNAs). Hay pocos datos en la literatura, describiendo esas moléculas en la infección por HTLV-1 en linfocitos T CD4⁺, como en el establecimiento de la enfermedad HAM/TSP. En el presente estudio, fue evaluada la expresión de miRNAs de los linfocitos T CD4⁺ aislados de individuos asintomáticos (HAC), pacientes HAM/TSP e individuos sanos (CT) por medio de PCR en tiempo real. El análisis de la expresión de los miRNAs en esas células reveló que 56 y 10 miRNAs se presentaban más de 1,5 veces aumentados en el grupo HAM/TSP y HAC, respectivamente. El miR-125b-1-1 presentó expresión significativamente mayor en el grupo HAC y el miR-146a, en el grupo HAM/TSP. El análisis *in silico* de predicción de blanco demostró que el gen *IFNG* era potencialmente blanco del miR-125b-1-1 y los genes *IRAK1* y *TRAF6* del miR-146a. Fue demostrado que la expresión de *IFNG* en el grupo HAC era 1,3 veces más elevada que el grupo CT y 1,8 veces más elevada en el grupo HAM que en el grupo CT. Hubo un aumento en la expresión de *TRAF6* de 15,7 y 1,5 veces en los grupos HAM/TSP y HAC, respectivamente. No fue observada diferencia en la expresión de *IRAK1* entre los tres grupos. Los ensayos de superexpresión del miR-125b-1-1 alteraron la expresión del *IFNG* y los del miR-146a alteraron la expresión del gen *IRAK1* y su proteína. Los resultados observados en este trabajo destacan la importancia de los miRNAs en la modulación de genes y proteínas importantes durante la infección por HTLV-1. La correlación entre el miR-125b-1-1 y el gen *IFNG* sugiere que este miRNA esté relacionado a los mecanismos de desarrollo de HAM/TSP. Además, la interacción entre el miR-146a y los genes *IRAK1* y *TRAF6* sugieren que este miRNA esté relacionado a mecanismos de establecimiento de la infección por HTLV-1 en linfocitos T CD4⁺.

Palabras-clave: HTLV-1; HAM/TSP; Linfocito T CD4⁺; microRNAs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da partícula viral do HTLV-1.	5
Figura 2. Modos de infecção do HTLV-1 por contato célula-célula.	9
Figura 3. Fluxograma da estratégia experimental.	20
Figura 4. Mapa dos vetores <i>reporter</i> e controle do <i>pMIR-REPORTTM Expression Vector</i>	34
Figura 5. Distribuição da CPV entre os indivíduos assintomáticos e HAM/TSP	50
Figura 6. Expressão relativa dos miRNAs let-7a, miR-125b-1-1, miR-146a, miR-17-5p, miR-221, miR-223, miR-26a e miR-34a em amostras de linfócitos T CD4 ⁺ ...	55
Figura 7. Quantificação dos genes IFNG, IRAK1 e TRAF6 em amostras de linfócitos T CD4 ⁺	57
Figura 8. Correlação entre a expressão dos genes IFNG, TRAF6 e IRAK1 com a CPV.....	58
Figura 9. Eletroforese após anelamento dos oligonucleotídeos	59
Figura 10. Eletroforese do vetor pMirReport digerido com as enzimas de restrição SpeI e HindIII.....	60
Figura 11. Sequenciamento dos vetores pMIR-REPORT TM com os genes alvo	61
Figura 12. Ensaio de atividade de luciferase.....	62
Figura 13. Dot-plots da padronização dos reagentes lipídicos na transfecção de pré-miR-125b-1-1 em células MT2.....	63
Figura 14. Dot-plots da padronização do tempo de transfecção em células MT2.. ..	64
Figura 15. Dot-plots da padronização do volume de reagente e concentração de pré-miR-125b-1-1	65
Figura 16. Dot-plots da padronização do volume de reagente e morte celular	66
Figura 17. Dot-plots da padronização do volume de reagente e da concentração de pré-miR-125b-1-1.	67
Figura 18. Expressão relativa dos miRNAs e seus genes alvo após a transfecção dos pré-miRNAs.	68
Figura 19. Eletroforese das proteínas totais de células MT2 transfectadas com pré-miR-125b-1-1	69
Figura 20. Eletroforese das proteínas totais de células MT2 transfectadas com pre-miR-146a	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados na PCR confirmatória para HTLV-1/2	24
Tabela 2. Sequência dos primers utilizados para a quantificação da carga proviral.	26
Tabela 3. Sequências sintetizadas para clonagem no vetor pMIR-REPORT™ miRNA Expression Vector	32
Tabela 4. Primers para sequenciamento dos vetores.....	37
Tabela 5. Reagentes lipídicos utilizados na transfecção de células MT2.	39
Tabela 6. Relação de quantidade de Turbofect™ Transfection Reagent e concentração de pré-miRNAs em cada teste.....	40
Tabela 7. Características dos anticorpos primários.	43
Tabela 8. Caracterização dos indivíduos sadios e infectados pelo HTLV-1 em relação à idade e sexo.	46
Tabela 9. 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.	47
Tabela 10. Determinação da CPV dos indivíduos infectados pelo HTLV-1.	50
Tabela 11. Expressão relativa de miRNAs em células T CD4+ T isoladas de pacientes HAC e HAM/TSP - >1,5 vezes aumentada no grupo HAM/TSP.	51
Tabela 12. Expressão relativa de 10 miRNAs em células T CD4+ T isoladas de pacientes HAC e HAM/TSP - >1,5X aumentada no grupo HAC.	53
Tabela 13. Predição de genes alvo de miRNAs.....	56
Tabela 14. Região de ligação dos miR-146a e miR-125b-1-1 aos seus respectivos genes alvo.....	59
Tabela 15. Quantificação da expressão da proteína IRAK1 após transfecção das células MT-2 com pré-miR-146a..	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACD	= ácido citrato dextrose
Ago	= proteínas argonautas
APC	= alofocianina
ATLL	= leucemia/linfoma de células T do adulto
BHE	= barreira hemato encefálica
BSA	= soro albumina bovina
CA	= capsídeo
CD	= células dendríticas
cDNA	= ácido desóxirribonucleico complementar
CPV	= carga proviral
CT	= grupo controle
Ct	= <i>cluste of differentiation</i>
CTL	= linfócitos t citotóxicos
Cy3	= cianina 3
DAC	= doença arterio-coronariana
DGCR8	= <i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
Dicer	= ribonuclease tipo III
DMEN	= Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	= ácido desoxirribonucleico
dNTP	= desoxirribonucleotídeo trifosfatados
<i>dot-plot</i>	= gráfico de pontos
EA	= encefalomielite autoimune
EBV	= vírus Epstein-Baar
EDTA	= ácido etilenodiamino tetra-acético
Env	= glicoproteína do envelope viral
FACS	= tampão de lise de hemácias
FITC	= isotiocianato de fluoresceína
FSC	= <i>forward scatter</i>
GLUT-1	= transportador de glicose-1
GM-CSF	= fator de estimulação de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos
HAC	= indivíduos portadores de HTLV-1
HAM	= mielopatia associada ao HTLV
HCV	= vírus da hepatite C
HIV-1	= Vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
HPV	= papilomavirus
HSPG	= proteoglicanas de heparan sulfato
HTLV	= Vírus Linfotrófico de Células T Humanas
IFN	= interferon
IL	= interleucina
IN	= integrase
LB	= <i>Luria-Bertani broth</i>
MA	= matrix viral
miRNA	= microRNA

mRNA	= Ácido ribonucleico mensageiro
NC	= nucleocapsídeo
NIH	= <i>National Institutes of Health</i>
NK	= células natural killers
nm	= nanômetros
NRP-1	= neurofilina-1
ORF	= fase de leitura aberta
pb	= pares de base
PBMC	= células mononucleares de sangue periférico
PBS	= tampão salina fosfato
PCR	= reação em cadeia da polimerase
PE	= ficoeritrina
Percp	= complexo peridina-clorofila
pré-miRNA	= precursores de microrna
pri-miRNA	= transcrito primário de microrna
PVDF	= polifluoreto de vinilideno
qPCR	= PCR Tempo Real
RISC	= complexo de silenciamento induzido de RNA
RNA	= ácido ribonucleico
RNAi	= ácido ribonucleico de interferência
RNA _m	= ácido ribonucleico mensageiro
RNA _t	= ácido ribonucleico transportador
RNU	= ácido ribonucleico nucleolar
RPMI	= <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	= transcrição reversa
SBF	= soro bovino fetal
SDS	= dodecil sulfato de sódio
siRNA	= small interference rna
SLTV-3	= vírus linfotrópico de células t de símios
SNC	= sistema nervoso central
SSC	= <i>side scatter</i>
Tax	= fosfoproteína transativadora do HTLV-1
<i>tax</i>	= gene regulador de transativação do HTLV-1
Th1	= linfócitos T <i>helper</i> tipo 1
TNF	= fator de necrose tumoral
TR	= transcriptase reversa
TSP	= pararestesia espática tropical
URE	= unidades de expressão relativa
UTR	= <i>untranslated region</i>
UV	= ultra-violeta
V	= volts
VSV	= vírus da estomatite vesicular

***Nota sobre as nomenclatura**

Os nomes de genes serão mantidos em inglês, seguindo a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*), como por exemplo LFA-1 (leukocyte function-associate antigen 1), SRF (*serum response factor*).

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
RESUMEN	iii
LISTA DE FIGURA	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	vi
I. INTRODUÇÃO.....	2
1. Vírus Linfotrópico de Células T Humanas (HTLV)	2
2. Epidemiologia da infecção pelo HTLV-1	3
3. Estrutura e organização genômica do HTLV-1	4
3.1. Estrutura viral.....	4
3.2. Organização genômica	5
4. Ciclo de replicação viral	6
5. Transmissão viral.....	7
6. Manifestações clínicas	10
6.1. Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL)	10
6.2. Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP).....	11
7. MicroRNAs	12
7.1. Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs	14
7.2. miRNAs e interação vírus-hospedeiro	15
II. OBJETIVOS	17
1. Objetivo Geral	18
2. Objetivos Específicos.....	18
III. METODOLOGIA.....	19
1. Análise <i>in silico</i>	21
1.1. Painel de miRNAs.....	21
1.2. Predição de alvos de miRNAs	21
2. Casuística	21
3. Aspectos Éticos	22
4. Sorologia e PCR para HTLV-1/2.....	22
4.1. Sorologia para HTLV-1/2	22
4.2. Extração de DNA.....	22
4.3. Reação de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	23

5. Contagem global de leucócitos	24
6. Contagem de células CD4 ⁺ e CD8 ⁺	24
7. Quantificação absoluta da carga proviral (CPV) do HTLV-1	25
7.1. Cultivo e expansão da linhagem celular MT-2	25
7.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	26
8. Isolamento de células CD4 ⁺	27
8.1. Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC).....	27
8.2. Separação imunomagnética de linfócitos T CD4 ⁺	28
8.3. Avaliação da pureza das células isoladas	28
9. Extração e quantificação de RNA total	29
10. Validação da expressão dos miRNAs.....	30
10.1. Reação de transcrição reversa – miRNA.....	30
10.2. Reação de Amplificação	30
11. Quantificação da expressão genes alvo dos miRNAs	31
11.1. Obtenção do cDNA.....	31
11.2. Reação de Amplificação	31
12. Ensaios de validação do gene alvo.....	31
12.1. Desenho dos oligonucleotídeos para clonagem em vetor de expressão.....	32
12.2. Anelamento dos oligonucleotídeos	32
12.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	33
12.4. Purificação da banda de oligonucleotídeos de gel de poliacrilamida.....	33
12.5. Linearização do vetor pMIR-REPORT e clonagem do gene alvo	33
12.6. Transformação bacteriana com os vetores <i>reporter</i> e controle.....	35
12.7. Extração de DNA plasmidial	35
12.8. Sequenciamento dos clones <i>reporter</i>	36
12.9. Transfecção dos vetores em células HEK-293T	36
12.9.1. Cultivo das células da linhagem HEK-293T.....	36
12.9.2. Transfecção dos vetores	36
12.10. Sequenciamento dos vetores de expressão pMIR-Report™ miRNA Expression Vector System	37
13. Ensaio funcional.....	38
13.1 Cultura de células da linhagem MT-2	38
13.1. Padronização da transfecção dos miRNAs miméticos (pré-miRs) em células MT-2.....	38
13.1.1. Padronização do reagente de transfecção	38
13.1.2. Padronização da quantidade de RNA	39

13.1.3. Padronização do tempo de incubação	40
14. Transfecção do pré-miR em células MT-2	40
14.1. Quantificação da expressão dos genes alvo e dos genes de miRNAs nas células MT2 transfectadas.....	41
14.1.1. Quantificação dos miRNAs.....	41
14.1.2. Quantificação dos genes alvo.....	41
14.2. Extração e quantificação das proteínas das células MT-2 transfectadas	41
14.2.1. Extração das proteínas totais	41
14.2.2. Quantificação das proteínas totais	41
14.2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	42
14.2.4. <i>Western Blotting</i>	43
14.3. Quantificação da expressão das proteínas.....	44
15. Análises estatísticas	44
IV. RESULTADOS	45
1. Caracterização dos indivíduos infectados pelo HTLV-1.....	46
2. Contagem e avaliação da pureza das células CD4 ⁺	47
3. Quantificação da carga proviral (CPV).....	50
4. Seleção dos miRNAs por análise do painel de expressão em linfócitos T CD4 ⁺ e análise <i>in silico</i>	51
5. Validação da expressão dos miRNAs.....	54
6. Análise <i>in silico</i> para predição de alvos dos miRNAs	56
7. Quantificação dos genes alvo	57
8. Validação dos genes alvo	58
8.1. Clonagem dos genes alvo em vetor de expressão.....	58
8.2. Sequenciamento dos clones	60
8.3. Transfecção dos vetores em células HEK-293T	61
9. Ensaios funcionais	62
9.1. Padronização do processo de transfecção dos miRNAs miméticos em células MT-2	62
9.2. Transfecção dos pré-miRNAs em células MT-2	67
V. DISCUSSÃO.....	72
VI. CONCLUSÃO.....	84
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXOS	99
ANEXO I – Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa	103
ANEXO II – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	103

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Vírus Linfotrópico de Células T Humanas (HTLV)

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus descrito em humanos (1980). Em 1980, um grupo de pesquisa do *National Institutes of Health* (NIH), liderado pelo Dr. Robert Gallo, descreveu o isolamento de um vírus presente em células de sangue periférico de um paciente afro-americano que apresentava uma doença linfoproliferativa, que foi nomeado como Vírus de linfoma cutâneo de células T humanas (HTLV) (Poiesz et al., 1980). Posteriormente, foi reconhecido como um caso de Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL), a qual foi originalmente descrita no Japão em 1977 por Takatsuki e colaboradores. Em paralelo, foi estabelecido que havia associação causal entre ATLL e HTLV-1 (Popovic et al., 1982). Em 1983, um grupo francês iniciou uma série de estudos na Martinica (ilha francesa no Caribe) e na Guiana Francesa a fim de investigar a epidemiologia e o impacto clínico do HTLV-1 nesta área, levando-os a associar este retrovírus a uma neuromielopatia crônica, originalmente denominada Paraparesia Espástica Tropical (TSP) (Gessain et al., 1985). Uma moléstia similar foi descrita na mesma época no Japão e classificada como mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM) (Osame et al., 1986). Descobriu-se mais tarde que as duas descrições relatavam a mesma doença, que atualmente é referida como mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (Osame et al., 1986).

O HTLV-1 ainda foi associado a outras condições clínicas, incluindo dermatite infecciosa, uveíte, artropatia associada ao HTLV-1, entre outras (LaGrenade et al., 1990; Mochizuki et al., 1996; Nishioka et al., 1989).

Desde o isolamento do HTLV-1, mais três tipos virais foram descritos, o HTLV-2 (Kalyanaraman et al., 1982), HTLV-3 (Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005) e HTLV-4 (Wolfe et al., 2005). O HTLV-2 foi isolado de uma linhagem contínua de células T obtidas de um paciente com tricoleucemia (leucemia benigna de células pilosas) e compartilha 65% de similaridade na sequência de nucleotídeos com o HTLV-1 (Sodroski, 1992), o que determina a codificação e a síntese de diversos produtos gênicos semelhantes. Este vírus não causa leucemia, embora alguns indivíduos infectados possam desenvolver uma linfocitose benigna e, raramente, alguns sintomas neurológicos (Biswas et al., 2009; Dooneief et al., 1996; Feuer and

Green, 2005; Hjelle et al., 1992) Atualmente, apenas quatro casos isolados do HTLV-3 foram relatados, obtidos de indivíduos camaronenses (Calattini et al., 2009; Zheng et al., 2010). Sugere-se que este vírus tenha origem zoonótica, uma vez que se acredita que o Vírus Linfotrópico de Células T de Símios tipo 3 (SLTV-3) tenha sido transmitido a humanos por primatas não humanos infectados pelo vírus homólogo símio. O HTLV-4 consiste de apenas um caso humano, cujo provirus foi obtido de um caçador Camaronense. Para este tipo viral, não foi identificado nenhum equivalente de STLV (Wolfe et al., 2005). As poucas informações existentes sobre o HTLV-3 e HTLV-4 não são suficientes para determinar se estes vírus podem ser transmitidos entre humanos e se são capazes de desencadear doenças em seus portadores (Wolfe et al., 2005).

2. Epidemiologia da infecção pelo HTLV-1

Poucos estudos estimam a prevalência global da infecção pelo HTLV-1. O dado mais frequentemente relatado na literatura data de 1993 (de The and Bomford, 1993), o qual estima que o número de pessoas infectadas pelo vírus seja de 10-20 milhões. Entretanto, um estudo recente estima que o número de indivíduos infectados pelo HTLV-1 seja entre cinco e dez milhões (Gessain and Cassar, 2012). No entanto, os dados utilizados nessa estimativa levaram em consideração apenas 1,5 bilhões de indivíduos das conhecidas regiões endêmicas com dados epidemiológicos confiáveis (Gessain and Cassar, 2012). Embora presente em todo o mundo, algumas regiões apresentam uma maior prevalência como o sudoeste do Japão, a África intertropical, o Oriente Médio, o Caribe e a América do Sul, incluindo Colômbia, Guiana Francesa e partes do Brasil. Na Europa, apenas a Romênia apresenta-se como uma região endêmica do HTLV-1. A origem e causa dessa distribuição geográfica não é bem definida, mas sugere-se que esteja relacionada a algum fator dos grupos populacionais dessas regiões, seguida por uma alta taxa de transmissão viral. Nessas áreas endêmicas, as taxas de soroprevalência variam de 0,1 a 30% (Blattner et al., 1982; Gotuzzo et al., 2000; Saxinger et al., 1984; Sonoda et al., 2011).

A maior parte dos estudos de epidemiologia é realizada em populações específicas, principalmente em doadores de sangue, gestantes e pacientes hospitalizados. As características epidemiológicas e demográficas de doadores

de sangue são diferentes de acordo com a região. Além disso, a prevalência da infecção pelo HTLV-1 varia de acordo com a idade, sexo e nível econômico na maioria das áreas endêmicas. Dessa forma, a prevalência real é provavelmente superior, na maioria dos casos, do que constatado em doadores de sangue (revisado por (Gessain and Cassar, 2012). Dessa forma, estima-se que no Brasil, 2,5 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 (Carneiro-Proietti et al., 2002), e o cidade de Salvador é a mais prevalente, com 1,8% de indivíduos infectados na população geral (Farias de Carvalho, 1997). Na região de Ribeirão Preto, a soroprevalência entre doadores de sangue é de 0,1% (Pinto et al., 2012). Essa prevalência é maior que cidades como Manaus (0,08%) e Florianópolis (0,08%) (Galvao-Castro et al., 1997) e menor do que a observada no estado de São Paulo (0,2%) (Ferreira Junior et al., 1995) e Recife (1,35%) (Galvao-Castro et al., 1997).

3. Estrutura e organização genômica do HTLV-1

3.1. Estrutura viral

O HTLV-1 pertence à família *Retroviridae*, à subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus*. Este vírus consiste de um envelope, um nucleocapsídeo icosaédrico e um nucleóide, medindo cerca de 100 nm. O envelope viral é constituído por uma bicamada lipídica de origem celular, a qual contém uma proteína transmembrana (gp21) ancorada em uma glicoproteína de superfície (gp46). Junto à membrana do envelope encontra-se a matrix viral (MA), composta por proteínas p19. O capsídeo (CA) é composto por proteínas codificadas pelo gene *gag* e constitui o cerne da partícula viral. Esta estrutura abriga o genoma viral composto por duas fitas de RNA, as quais estão associadas a pequenas proteínas, chamadas de proteínas do nucleocapsídeo (NC). Outras proteínas estão presentes no interior do CA, como a transcriptase reversa (TR) e integrase, essenciais no processo de integração do DNA proviral no genoma da célula hospedeira.

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da partícula viral do HTLV-1. As linhas apontam as principais proteínas estruturais (Lairmore et al., 2012)

3.2. Organização genômica

Este retrovírus possui duas fitas de RNA fita simples, e o genoma proviral contém aproximadamente 9032 pb (Seiki et al., 1983) flanqueados por duas regiões repetidas e terminais, chamadas LTR (*long terminal repeats*). O genoma do HTLV-1 codifica as proteínas estruturais e enzimáticas típicas dos retrovírus (Gag, Pol e Env). Além disso, o HTLV-1 utiliza de *splicing* alternativo e códon de iniciação internos para produzir várias proteínas regulatórias e acessórias. Esses iniciam quatro fases de leitura aberta (ORFs) na região pX do genoma viral, entre *env* e a extremidade 3'LTR.

O gene *pol* codifica a TR, ribonuclease H (RNaseH), integrase e protease. O gene *gag* codifica um precursor poliprotéico, e sua clivagem origina as proteínas da MA (p19), do CA (p24) e do NC (p15). O gene *env* codifica as proteínas do envelope viral. A proteína precursora (gp62) é clivada para gerar os produtos maduros, a gp46 e a gp21. O gene *pro* é codificado por desvio de leitura dos genes *gag* e *pol*. A enzima Pro atua sobre as cadeias poliprotéicas, clivando-as para a formação das proteínas estruturais maduras encontradas na partícula viral.

A região pX contém quatro ORFs que codificam proteínas regulatórias (Tax, Rex, HBZ) e acessórias (p12/p8, p13, p30). A proteína Rex regula a expressão

gênica viral em nível postranscricional. A proteína Tax modula a expressão viral recrutando fatores de transcrição para a região 5'LTR. Além disso, Tax atua em importantes vias de processos de proliferação, ciclo celular e apoptose, ativando fatores de transcrição como CREB (*cAMP response function-associated elemento binding*), SRF (*serum response binding 1*), AP-1 (*activator protein 1*) e NF- κ B (*nuclear fator κ B*), e atuando diretamente em reguladores de ciclo celular e *checkpoints*. A proteína HBZ é codificada por um RNA mensageiro *anti-sense*, e sequestra fatores de transcrição diminuindo a transcrição do genoma viral mediada por Tax. Ainda, HBZ reprime a via clássica de sinalização de NF- κ B. Por fim, sugere-se que esta proteína esteja envolvida em etapas finais da oncogênese.

4. Ciclo de replicação viral

A entrada do vírus na célula hospedeira ocorre por meio de interações específicas entre a glicoproteína do envelope viral (Env) e receptores celulares. As moléculas de proteoglicanas de heparan sulfato (HSPGs) e a neurofilina-1 (NRP-1) são utilizadas para uma ligação inicial com a célula, e o transportador de glicose-1 (GLUT-1) é recrutado durante o processo de entrada do vírus no citoplasma e fusão na membrana plasmática. A entrada é seguida pelo desnudamento do capsídeo, que é liberado no conteúdo celular. Em seguida, o RNA viral é transcrito em DNA pela RT usando como *primer* um RNAt (RNA transportador) específico, e em seguida é transportado para o núcleo e integrado ao cromossomo hospedeiro, sendo caracterizado, nesse momento, como provírus.

O processo de integração do provírus marca o final da fase precoce do ciclo de multiplicação viral e se inicia a fase tardia, caracterizada pela síntese do RNA viral, que é mediada por enzimas do hospedeiro. A síntese do RNA viral leva à formação de um longo transcrito primário, o qual é processado para formar os RNAs mensageiros (mRNA) e o RNA genômico.

As proteínas são sintetizadas nos ribossomos e algumas são processadas pós-traducionalmente para serem utilizadas no processo de montagem da partícula viral. O HTLV-1 contém um RNA dimérico, que é altamente condensado e compactamente enovelado pelas proteínas virais p15. O processamento dos precursores Gag e Gag-Pro-Pol está ligado à montagem e brotamento e é controlado de forma que os precursores não são clivados até a montagem da

partícula viral. A maturação é um processo complexo, necessário para a formação da partícula infecciosa, na qual ocorre o processamento proteolítico das proteínas do CA, obtendo-se, finalmente, a partícula viral madura.

5. Transmissão viral

A transmissão viral ocorre por três vias: (1) Vertical, atribuída principalmente pela amamentação por períodos superiores aos 6 meses de idade (Hino, 2011); (2) sexual (Kaplan et al., 1996; Murphy et al., 1989a); (3) parenteral, que consiste na transmissão por hemoderivados contaminados, principalmente linfócitos contaminado pelo HTLV-1 (Okochi et al., 1984). O HTLV-1 também é encontrado em usuários de drogas intravenosas, mas em uma extensão bem menor do que o HTLV-2 (Murphy et al., 1999). A transmissão viral pelo aleitamento materno é a principal via de disseminação do vírus com eficiência de cerca de 20% (Kusuhara et al., 1987).

Uma vez na corrente sanguínea, o HTLV-1 infecta preferencialmente linfócitos T CD4⁺, entretanto sabe-se que os linfócitos T CD8⁺ são importantes reservatórios virais. No entanto, o vírus possui uma predileção por células T CD4⁺, já que a eficiência de sua entrada depende 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).

A transmissão do HTLV-1 a partir de partículas virais livres e infectantes tem sido alvo de muitas discussões. Os primeiros estudos demonstravam a necessidade da célula infectada pelo vírus no mecanismo de transmissão, ao observarem que pacientes que haviam submetidos à transfusão com componentes celulares do sangue de indivíduos infectados pelo HTLV-1 tornaram-se infectados (Maeda et al., 1984; Miyamoto et al., 1984). Por outro lado, pacientes transfundidos com produtos acelulares como plasma, não eram infectados pelo HTLV-1 (Lairmore et al., 1989; Maeda et al., 1984). Corroborando, estudos *in vitro* demonstraram ausência de infecção viral em linfócitos T isolados do sangue periférico quando em contato com partículas virais livres e uma eficiente infecção quando as mesmas células (linfócitos T) foram cocultivadas com linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1 (Popovic et al., 1983; Yamamoto et al., 1982).

Entretanto, outros estudos *in vitro* demonstraram que a partícula viral livre é capaz de infectar outros tipos celulares. Vários estudos evidenciaram que células dendríticas (CD) primárias são rotineiramente infectadas por partículas virais livres

(Jain et al., 2009; Jones et al., 2008; Valeri et al., 2010). Além disso, linfócitos T cocultivados com CDs são rapidamente infectados após adição de partículas virais.

As partículas virais livres do HTLV-1 são raramente detectadas em plasma ou soro de indivíduos infectados por este vírus. Essa informação explica o fato dos pacientes transfundidos com plasma/soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1 não sofrerem conversão. As partículas virais livres do HTLV-1 são infecciosas, no entanto, como não há níveis detectáveis de vírus nesse produto sanguíneo a infecção não ocorre por esta via. Essa informação indica que quando ocorre a transfusão de plasma/soro infectados pelo HTLV-1 para indivíduos saudáveis, a infecção não ocorre devido aos níveis indetectáveis do vírus, e não porque as partículas virais livres não são infecciosas (revisado por (Pique and Jones, 2012).

O contato célula-célula no qual ocorre a propagação viral pode ocorrer entre CDs e linfócitos T, ou apenas entre linfócitos T. Recentemente, foi revisado por Pique e Jones (2012) quatro modos de infecção por contato célula-célula (Figura 2): A) sinapse viral: Linfócitos T infectados pelo HTLV-1 formam espontaneamente conjugados com linfócito T não infectados. As proteínas virais Gag e Env, bem como os RNAs genômicos são direcionados até o ponto de contato entre as células por transporte ativo do citoesqueleto, indicando que a montagem viral ocorre na junção das células. Sugere-se que o contato entre as células depende de interações entre a proteína Env e receptores da célula alvo, como NRP-1 e Glut-1 (Ghez et al., 2006), além de moléculas de adesão ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) e LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen 1*) (Barnard et al., 2005). Este contato estável entre as células determina um espaço intracelular conhecido como fissura sináptica (Majorovits et al., 2008), favorecendo a transferência do HTLV-1, de forma polarizada, da célula infectada para a célula não infectada; B) conduítes celulares: são extensões da membrana plasmática nas quais o vírus pode se propagar entre uma célula infectada para outra não infectada (Van Prooyen et al., 2010); C) biofilmes virais adesivos: células infectadas pelo HTLV-1 que possuem em sua superfície *clusters* de partículas virais maduras envoltos em uma matrix extracelular, chamada de biofilme (Pais-Correia et al., 2009). A transferência desses biofilmes virais para um linfócito T CD4⁺ não infectado ocorre no contato com linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1, que apresente esse biofilme viral em sua superfície (Pais-Correia et al., 2009); D) células apresentadoras de antígenos: o HTLV-1 pode ser propagado de CDs para linfócitos T CD4⁺ por meio de infecção *cis* ou *trans*. A infecção *cis* ocorre quando CDs são infectadas e, em seguida, os vírus

produzidos são transferidos para um linfócito T não infectado (Jones et al., 2008). A infecção *trans* ocorre quando DCs capturam os vírus produzidos pelos linfócitos T e transmitem o mesmo para outros linfócitos T CD4⁺ antes mesmo de sua infecção (Jain et al., 2009; Jones et al., 2008). Essas diferentes formas de infecção não são mutuamente exclusivas (Jin et al., 2010).

Figura 2. Modos de infecção do HTLV-1 por contato célula-célula. (A) Sinapse viral, (B) Conduítes celulares, (C) *Assembléias* virais extracelulares e (D) Células apresentadoras de antígenos (Pique and Jones, 2012).

Vários estudos demonstraram que o sangue periférico de indivíduos infectados pelo HTLV-1 continha clones de várias células infectadas com o mesmo sítio de integração viral (Leclercq et al., 1998; Wattel et al., 1995), indicando que eles foram

derivados de uma mesma célula infectada. Outros estudos demonstraram que clones específicos podem persistir durante anos em um dado indivíduo (Cavrois et al., 1996; Etoh et al., 1997).

A presença desses clones indica que em vez de se propagar de célula em célula, o HTLV-1 persiste em um indivíduo primariamente por replicação mitótica das células infectadas. Consistente com isso, a quantidade de provírus nas células infectadas (conhecida como carga proviral) permanece estável durante toda a vida da pessoa. Além disso, o genoma do HTLV-1, diferente do HIV-1, possui pouca variação entre indivíduos, corroborando com o fato de o genoma ser replicado pela DNA polimerase, e não pela transcriptase reversa, mais propensa a erros. Dessa forma, o HTLV-1 persiste no indivíduo infectado por meio de dois estágios. Logo após a exposição do indivíduo ao vírus, o HTLV-1 se propaga por meio de contato célula-célula. Em seguida, durante o estágio crônico da infecção, o vírus persiste por meio de expansão clonal.

O HTLV-1 apresenta uma notável estabilidade genética, incomum para um retrovírus. Essa característica suporta a hipótese de que a amplificação viral *in vivo* por expansão clonal das células infectadas seja uma das mais importantes, e pode ser utilizada como uma ferramenta molecular para rastrear os meios de disseminação do vírus entre populações (Gessain et al., 1992).

6. Manifestações clínicas

O HTLV-1 é o agente causal de duas doenças, a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). A maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanece como portador assintomático durante toda a vida. Entretanto, há risco de 0,3- 4% de esses indivíduos desenvolverem HAM/TSP (Kaplan et al., 1990) e 1-5% de desenvolverem ATLL (Murphy et al., 1989b).

6.1. Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL)

A ATLL foi primeiramente a primeira doença maligna identificada como causada por um retrovírus. A ATLL é definida como uma doença fatal das células T CD4⁺ periféricas e que contém o DNA proviral do HTLV-1 (provírus) integrado em seu genoma.

O HTLV-1, embora apresente um potencial genômico oncogênico, não possui nenhum oncogene derivado de seu genoma celular. Sua capacidade oncogênica advém da atividade reguladora de Tax, que é capaz de alterar a expressão de genes celulares envolvidos no controle do crescimento celular (Yoshida, 2001).

O início da doença é precedido por um longo período de latência, havendo uma fase pré-ATL, definida pela expansão oligoclonal dos linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1. A doença é heterogênea e possui quatro apresentações clínicas distintas: indolente ou *smouldering*, crônica, aguda e linfomatosa (Shimoyama, 1991). A sobrevida média das duas primeiras formas é de dois anos ou mais, e, em contraste, nas formas agudas e linfomatosa observa-se uma sobrevida média menor que seis meses. Os pacientes com ATLL são submetidos à poliquimioterapia, entretanto, o tratamento existente não aumenta a sobrevida média (Yamaguchi and Watanabe, 2002).

6.2. Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP)

A patogênese de HAM/TSP não foi totalmente elucidada e fatores virais e do hospedeiro, como carga proviral e resposta imunológica são fundamentais na progressão da doença (Bangham and Osame, 2005; Lepoutre et al., 2009). Três mecanismos principais foram propostos a fim de explicar o papel do HTLV-1 no desenvolvimento da HAM/TSP, o da citotoxicidade direta, o da autoimunidade, e o do dano colateral. No primeiro mecanismo, o dano neurológico é uma consequência direta da resposta antiviral de linfócitos T citotóxicos (CTL). Neste processo, pressupõe-se que o HTLV-1 infecta células residentes no sistema nervoso central, como astrócitos, neurônios e oligodendrócitos, os quais apresentariam antígenos virais em sua superfície celular. Os CTLs específicos atravessariam a barreira hematoencefálica (BHE), e encontrariam as células infectadas, causando sua morte por liberação de citocinas. No segundo mecanismo, uma resposta autoimune seria ativada pela reatividade cruzada de proteínas neuronais com anticorpos anti-Tax. Os linfócitos T CD4⁺ encontrariam o antígeno viral na periferia e ao atravessarem a BHE, confundiriam a célula neuronal com uma célula infectada, disparando uma resposta imunológica contra essas células. No terceiro mecanismo, linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1 e CTLs específicos contra o vírus migrariam através da

BHE, se encontrariam no SNC e as células da glia seriam degradadas pelas citocinas pró-inflamatórias liberadas pelos CTLs contra os linfócitos T CD4⁺ infectados.

Linfócitos T CD4⁺ e CTLs específicos para o HTLV-1 secretam citocinas pró-inflamatórias, como interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1, IL-6, fator de estimulação de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), quimiciocinas e metaloproteinases potencialmente inflamatórias (Biddison et al., 1997; Kuroda et al., 1993; Ohbo et al., 1991), as quais são tóxicas em altas concentrações, corroborando com o terceiro mecanismo de desenvolvimento de HAM/TSP ou mecanismo dano colateral.

Muitos debates inerentes à função da resposta imunológica na determinação das manifestações clínicas relacionadas ao HTLV-1 questionam como a maioria dos indivíduos soropositivos permanece assintomática e portadores do vírus, enquanto uma pequena parcela desenvolve doença inflamatória crônica conhecida, como HAM/TSP. Diversos fatores parecem estar envolvidos na interação vírus/hospedeiro e no aparecimento das patologias, entretanto, os mecanismos não estão totalmente esclarecidos (Sabouri et al., 2005). A maioria dos estudos genotípicos do HTLV-1 não mostra associação entre variantes do vírus e o risco de se desenvolver HAM/TSP (BANGHAM & OSAME, 2005; KASHIMA et al. 2006). Vários estudos sugerem que alguns fatores como subgrupo viral, resposta imunológica e características genéticas do hospedeiro podem estar envolvidos com o desenvolvimento dos sintomas (Catalan-Soares et al., 2009; Haddad et al., 2011; Rocha-Junior et al., ; Talledo et al.). Uma alta carga proviral (número de cópias do HTLV-1 integradas no genoma do hospedeiro) (CPV) é um dos melhores preditores do desenvolvimento de HAM/TSP, entretanto vários pacientes com alta CPV mantêm-se assintomáticos durante toda a vida (Iwanaga, 2010). Entretanto não há um marcador biológico que caracterize o estabelecimento da doença em alguns indivíduos.

7. MicroRNAs

O completo sequenciamento do genoma de mamíferos permitiu o estudo aprofundado do mesmo e, dessa forma, tornou-se cada vez mais claro a quantidade de regiões intergênicas existentes. Somente 2% do genoma humano consistem em

sequências codificantes para genes conhecidos (revisado por (Hammond, 2006). Entretanto, dados sugerem que 50% do genoma é transcrito em RNA (Carninci et al., 2005; Cheng et al., 2005b; Katayama et al., 2005), sendo que a maioria não é traduzido em proteína. Um grupo de RNAs não codificadores são os microRNAs (miRNAs). Estes são desencadeadores endógenos do processo de RNA de interferência (RNAi).

RNAi é uma ferramenta utilizada pela maquinaria celular que ocorre no citoplasma, cuja função é inibir a tradução do RNA mensageiro (RNAm) alvo pela utilização de um pequeno RNA dupla-fita. Em humanos, os mecanismos de interferência mais estudados envolvem miRNAs e *small interference* RNA (siRNAs) (Marquez and McCaffrey, 2008). As principais diferenças entre siRNAs e miRNAs em mamíferos, consiste que os primeiros são produtos de RNAs fita-dupla totalmente complementares e exógenos, e os segundos são endógenos e processados de precursores *stem-loop* com características de fita dupla incompleta (Tomari and Zamore, 2005). Em 1993, Lee e colaboradores demonstraram que o gene *lin-4*, de *Caenorhabditis elegans*, não era traduzido em proteína, mas originava dois pequenos RNAs. Estes foram denominados de *let-7* e assim foram descritos os primeiros miRNAs (Lee et al., 1993). Desde então, demonstrou-se que esses pequenos RNAs são expressos em quase todos os seres eucariotos e em alguns vírus, e que são importantes reguladores da expressão gênica (Zamore and Haley, 2005).

miRNAs são pequenas moléculas de RNA fita-simples não codificantes, variando entre 18 a 24 nucleotídeos de comprimento (Hammond, 2006). Atuam como reguladores da expressão gênica em nível pós-transcricional pela degradação de RNAm alvos específicos ou pela supressão da tradução (Carrington and Ambros, 2003; Dykxhoorn et al., 2003; Grewal and Moazed, 2003; Pickford and Cogoni, 2003; Vasudevan et al., 2007). Os miRNAs regulam vários processos celulares cruciais, como apoptose (XU et al., 2004), metabolismo (Poy et al., 2004), proliferação (Cheng et al., 2005a), desenvolvimento (Karp and Ambros, 2005) e imunidade (revisado em (Sonkoly et al., 2008). Além disso, participam do controle de doenças, como câncer e possivelmente desordens neuronais de mamíferos (Kosik, 2006).

Em humanos existem mais de 2.500 miRNAs identificados no genoma humano (miRBase Registry, release 19; (Griffiths-Jones, 2004; Kozomara and Griffiths-Jones,

2011). Embora os alvos transcricionais sejam previstos, a maioria destes não foi validada, o que torna rica essa área para investigação.

Estudos têm demonstrado que alguns vírus codificam seu próprio miRNA, como o vírus Epstein-Barr (Pfeffer et al., 2004), citomegalovírus humano (Pfeffer et al., 2005), e o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (Omoto and Fujii, 2005), entre outros. Além dos miRNAs virais, os que são produzidos pela célula hospedeira também podem atuar mediando a interação vírus-hospedeiro.

7.1. Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs

A síntese dos miRNAs é um processo complexo e coordenado, envolvendo dois processos distintos, em que operam grupos de enzimas e proteínas nucleares e citoplasmáticas. Os genes de miRNAs, os quais podem se localizar em regiões de éxons, introns e até mesmo intergênicas são transcritos pela RNA polimerase II, dando origem a um transcrito primário de miRNA (pri-miRNA) de 100 a 1000 nucleotídeos. Esses pri-miRNAs possuem um *loop* ou mais, *cap* na região 5' e poliadenilação na região 3' (Cai et al., 2004). O pri-miRNA formado é reconhecido pelo complexo Drosha-DGCR8 por meio da estrutura secundária *stem-loop*, resultando na excisão e liberação de precursores de miRNAs (pre-miRNAs) em forma de grampo (Denli et al., 2004). Estes miRNAs possuem aproximadamente 70 nucleotídeos e uma saliência de 2 nucleotídeos na região 3' (Basyuk et al., 2003) que permite o reconhecimento pelo complexo Exportina-5/Ran-GTP e o transporte para o citoplasma (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004; Zeng and Cullen, 2004).

No citoplasma, o pre-miRNA associa-se ao complexo de carregamento de RISC (complexo de silenciamento induzido por RNA). Este complexo inclui uma ribonuclease tipo III (Dicer), proteínas Argonautas (Agos) de ligação de RNA (Tan et al., 2011), a proteína adaptadora TRBP, que se liga à fita dupla de RNA (Chendrimada et al., 2005) e conecta a Dicer e as Agos e transfere o pre-miRNA para dentro do complexo RISC. A Dicer processa o pre-miRNA resultando em um miRNA dupla-fita maduro de aproximadamente 22 nucleotídeos (Chendrimada et al., 2005; Ketting et al., 2001). Em seguida, o complexo RISC seleciona apenas uma das fitas do duplex para permanecer ligada ao complexo, a qual é designada de fita “guia” e comumente a menos estável termodinamicamente na extremidade 5'-UTR (Schwarz et al., 2003). A outra fita do duplex é retirada do complexo e

subsequentemente degradada. Após a seleção da fita guia, o RISC é guiado até o RNAm alvo para que ocorra a regulação de sua expressão. O grau de complementaridade do complexo miRNA-mRNA tem sido considerado como um fator determinante no mecanismo regulatório promovido pelo processo de RNAi. O processo de regulação da expressão gênica tem como fator determinante a complementaridade da região 5' do miRNA, conhecida como região da semente (*seed region*), com a região alvo do RNAm. A complementaridade perfeita permite a clivagem do RNAm alvo, catalisada por argonauta (Ago) 2, enquanto que a compatibilidade parcial promove a repressão da tradução do mRNA (Zeng and Cullen, 2003).

7.2. miRNAs e interação vírus-hospedeiro

Um potencial envolvimento dos miRNAs nas doenças humanas já foi inferido em decorrência de funções biológicas dos mesmos. Estudos recentes sugerem que os miRNAs podem ser um fator contribuinte para o processo de neurodegeneração. Estudos relatam a participação dos miRNAs nas doenças de Alzheimer (Wang et al., 2008) e Parkinson (Kim et al., 2007). Ainda, estudos em mamíferos e invertebrados têm sugerido que os miRNAs estão envolvidos em neuroproteção (Bilen et al., 2006), síndrome do X frágil (Lin et al., 2006) e esquizofrenia (Perkins et al., 2007).

Os miRNAs também possuem importantes funções na replicação viral e podem ser usados pelo hospedeiro no controle da infecção viral. No herpes virus, estudos sugerem que o processo de infecção latente, no qual o vírus se mantém durante anos nas células, é estreitamente relacionado com a expressão de miRNAs. Acredita-se que estes miRNAs controlem funções virais e celulares minimizando a exposição das proteínas virais ao sistema imune do hospedeiro (revisado por (Grassmann and Jeang, 2008).

Foi descrito que o hsa-miR-122 participa do processo de replicação do vírus da hepatite C e quando inibido faz com que a quantidade de partículas virais produzidas pelos hepatócitos diminua significativamente. Outro exemplo é o HIV-1 (Houzet et al., 2008), cuja infecção faz com que células humanas infectadas apresentem mudanças na expressão dos miRNAs. Este trabalho demonstrou uma alteração no perfil de expressão de diversos miRNAs e que esta é dependente da carga viral e da

contagem de linfócitos T CD4⁺ dos indivíduos, sugerindo a utilização de miRNAs como marcadores prognósticos.

Os primeiros trabalhos que relacionaram a modulação da expressão de miRNAs humanos e a infecção pelo HTLV-1 foram os grupos de pesquisa de Pichler (Pichler et al., 2008) e Yeung (Yeung et al., 2008). Pichler e colaboradores demonstraram que miR-221, miR-24, miR-146a e miR-155 estavam com sua expressão aumentada em uma série de linhagens celulares derivadas de pacientes com ATLL, HAM/TSP e células transformadas por HTLV-1 ou Tax, enquanto que o miR-223 estava com sua expressão reprimida quando comparados com controles negativos. Ensaio funcionais demonstraram que a expressão do miR-146a estava diretamente relacionada à ativação pelo fator de transativação Tax (Pichler et al., 2008). Adicionalmente, no trabalho de Yeung e colaboradores foram observados que três miRNAs: miR-93, miR-130b e miR-18a, apresentaram uma expressão aumentada em linhagem celular de ATLL e amostras de PBMC de pacientes com ATLL agudo, quando comparadas com controles. Ainda neste estudo, foi demonstrado que a proteína supressora de tumor induzido por p53 (TP53INP1) era alvo de miR-93 e miR-130b (Yeung et al., 2008). Esses dois estudos demonstram que a infecção do HTLV-1 modula a expressão de miRNAs humanos.

A biologia das moléstias causadas pelo HTLV ainda não foi totalmente elucidada. Poucos estudos relacionam o processo de regulação pós-transcricional pelos miRNAs e os mecanismos que ocorrem durante o desenvolvimento dessas doenças. Sendo assim, a busca e avaliação de novos parâmetros que possam contribuir para esclarecimento da patogênese desta infecção é de extrema importância, uma vez que contribuirá para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e vacinais, além da possibilidade de ser utilizado como marcador prognóstico da doença.

Objetivos

II. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo avaliar, por meio de ensaios funcionais, o papel de microRNAs na infecção pelo HTLV-1.

2. Objetivos Específicos

- Seleção de miRNAs diferencialmente expressos em linfócitos T CD4+ proveniente de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (assintomáticos e HAM/TSP);
- Seleção de potenciais alvos gênicos por meio de análise *in silico*;
- Validação dos alvos dos microRNAs;
- Avaliação funcional dos microRNAs, por meio de ensaios utilizando miRNAs miméticos e antagonistas dos mesmos.

Metodologia

III. METODOLOGIA

Figura 3. Fluxograma da estratégia experimental. Cada procedimento contém o item que está descrito posteriormente.

1. Análise *in silico*

1.1. Painel de miRNAs

Os miRNAs utilizados durante este estudo, foram eleitos a partir de um painel composto por 160 miRNAs humanos (*TaqMan® MicroRNA Assays Human Panel Early Access Kit*, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) previamente avaliado em nosso laboratório. Nesta análise foram avaliados os linfócitos T CD4⁺ isolados de indivíduos infectados divididos em dois grupos: HAC e HAM/TSP.

Os seguintes critérios para a seleção dos miRNAs foram os seguintes: i) miRNAs diferencialmente expressos nos grupos de pacientes assintomáticos (HAC) e sintomáticos (HAM/TSP); ii) aqueles que, por análise *in silico*, forem potenciais reguladores de mecanismos virais/hospedeiro; e iii) os miRNAs previamente associados à funções biológicas definidas.

1.2. Predição de alvos de miRNAs

Para a predição de alvo, foi utilizado o banco de dados *online* mirGen mirGen ([/www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html](http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html)) (Megraw et al., 2006) (Megraw et al., 2006). Este banco de dados integra quatro algoritmos computacionais de predição de alvo de miRNAs: PicTar (pictar.mdc-berlin.de, New York University and Max Delbruck Centrum) (Krek et al., 2005), miRanda (cbio.mskcc.org/mirnaviewer) (John et al., 2005), TargetScan (www.targetscan.org), DIANA-microT (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/>).

2. Casuística

Foram colhidos 40 mL de sangue periférico (com heparina sódica) de um total de 53 indivíduos infectados HTLV-1, dos quais 32 eram portadores assintomáticos do HTLV-1 (HAC) e 21 pacientes com HAM/TSP (HAM/TSP). Todos os indivíduos incluídos no estudo foram e continuam sendo acompanhados no Ambulatório de Neurologia Tropical do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP/USP). OS mesmos foram avaliados pelo corpo clínico e diagnosticados com a presença ou ausência de manifestações clínicas associadas

ao HTLV-1. Adicionalmente, foram coletadas amostras de 33 indivíduos sadios e soronegativos para HTLV-1/2, candidatos voluntários à doação de sangue do Centro Regional de Hemoterapia, para compor o grupo controle (CT).

3. Aspectos Éticos

Os indivíduos incluídos neste estudo, sadios e portadores do HTLV-1, foram informados quanto ao procedimento de coleta e uso da amostra biológica no trabalho, e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP/USP, sob número de processo HCRP n° 12352/2006 (Anexo II).

4. Sorologia e PCR para HTLV-1/2

4.1. Sorologia para HTLV-1/2

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

4.2. Extração de DNA

Para a extração de DNA utilizou-se o kit *Super Quick Gene DNA Isolation* (Analytical Genetic Testing Center – AGTC, Denver, Colorado – EUA) a partir de 5 mL de sangue total coletados em tubos com EDTA.

As amostras foram centrifugadas a 1.500 x g durante 10 minutos e as células brancas, ou *buffy coat*, (item 3.8) foram coletadas e transferidas para um tubo de propileno de 15 mL. Adicionou-se às células, 10 mL de tampão de lise de glóbulos vermelhos gelado, homogeneizou-se durante 15 minutos em temperatura ambiente, e centrifugou-se a 1.500 xg durante 20 minutos. O tampão de lise foi adicionado novamente seguindo-se o mesmo procedimento. Em seguida, foram acrescentados 1,5 mL de tampão de lise de glóbulos branco (fornecidos pelo fabricante), e a

amostra foi incubada a 55°C durante 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 200 uL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% e 500 uL de reagente precipitante de proteínas. A mistura foi centrifugada a 1.500 x g durante 20 minutos após incubação a 55°C durante 15 minutos, e o sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com adição de duas vezes o volume de sobrenadante obtido de etanol absoluto (Merck, Marmstadt, Hessen – Alemanha). O DNA precipitado foi coletado e transferido para tudo de 1,5 mL estéril. Após evaporação do etanol, o DNA foi ressuspendido em 200 uL de água estéril tipo 1.

Por fim, o DNA extraído foi quantificado por espectrometria em comprimento de onda UV em 260nm (Spectronic 1201, Milton Roy), e armazenado a -20°C.

4.3. Reação de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras que tiveram resultado da sorologia para HTLV-1/2 positivas foram submetidas à confirmação da positividade pela metodologia de PCR *nested*. Foram utilizados *primers* para amplificação das regiões *tax* e *LTR* do genoma do HTLV-1, e para as regiões *pxA*, *pxB* e *LTR* do genoma do HTLV-2 (Tabela 1). A reação de PCR foi realizada de acordo com (Pinto et al., 2012). Foram utilizados 100-200ng de DNA, 0,25 pmol de cada *primer*, 0,2 mM de dNTP, 1X do tampão de MgCl₂ e 1,5 unidade da *Taq* DNA polimerase. As condições utilizadas para a termociclagem foram: ciclo inicial a 96°C por 5 minutos; 35 ciclos a 95°C por um minuto, 52-61°C por 1 minuto e 15 segundos, e 72°C por 1 minuto e 50 segundos; e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. Em seguida, foi realizada a segunda reação da PCR *nested* utilizando os *primers* internos com 3 µL dos produtos amplificados anteriormente e as mesmas condições de ciclagem.

Tabela 1. Sequências dos primers utilizados na PCR confirmatória para HTLV-1/2

Regiões	Primers externos	Sequências (5'-3')	Primers internos	Sequências (5'-3')
<i>tax</i> *	PX01	TCGAAACAGCCCTGCAGATA	PXI1	ATACAAAGTTAACCATGCTT
	PX02	TGAGCTTATGATTTGTCTTCA	PXI3	AGACGTCAGAGCCTTAGTCT
<i>LTR</i> *	LTR1	CATTTCTACTCTCACACG	LTRN1	TTGAAGAATACACCAACATCCC
	LTR2	GCCTCATAAGTACTCTT CGCAGTTCAGGAGGCCACCAC	LTRN2	GAACGCGACTCAACCGGCGTGGAT
<i>pxA</i> **	px101	GGCAATCTCCTAAAATAGTCT	px103	TTACAATCCTGTCTCCTCTCA
	px102	TGTGTGTAGGA ACATTTTGTGA	px104	AAGTTCTTCTAATCG TTTTAG
<i>pxB</i> **	px105	GCTTTCCCCACCCATGACATG	px107	ACCCCA TGTCATATTCTGCCA
	px106	GGGCCGTGG TTTCAGTTCCTA	px108	AGCCTTTACTTGGGATTGTTT
<i>LTR</i> **	BSQF6	CAGGGCGAGTCATCGACCCAAAAG	BSQF2	ACCGTCTCACACAAACAATCCC
	BSDR3	GAAGACAATGCTCCTAGGGCGGGC	BSDR4	GCGGGCCTGCCTATAGCGATG

(*) primers para HTLV-1; (**) primers para HTLV-2

5. Contagem global de leucócitos

A contagem global de leucócitos do sangue periférico foi determinada por meio do hemograma realizado no equipamento COULTER® A^c.T diff™ (Beckman Coulter, Fullerton, Califórnia, EUA).

6. Contagem de células CD4⁺ e CD8⁺

A contagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se o citômetro FACSCalibur (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia – EUA) e o reagente TriTEST CD4 FITC/CD8 PE/CD3 PercP com tubos TruCOUNT (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia – EUA). Os tubos TruCOUNT continham um material liofilizado de partículas fluorescente, que em contato com a amostra se dissolve, liberando um número conhecido de partículas. Esse sistema permite a

contagem absoluta de células positivas para os marcadores, comparando os eventos de células positivas com os eventos de partículas fluorescentes.

Para cada tubo contendo 50 uL de sangue total, foram adicionados 20 uL do reagente TriTEST CD4/CD8/CD3. A amostra foi homogeneizada e incubada ao abrigo da luz por 15 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 450 uL de tampão de lise de hemácias FACS *Lysing Solution* (1X) (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia – EUA), e a mistura foi homogeneizada e incubada nas mesmas condições anteriores. Por fim, as subpopulações celulares foram analisadas por meio do *software* MultiSET (Becton & Dickinson, San Jose, Califórnia – EUA).

Um total de 10.000 eventos foi adquirido e estabeleceu-se uma região correspondente à população linfocitária, em função da baixa granularidade celular (*side scatter* – SSC) e da marcação positiva para CD3. Das células selecionadas nesta região foram quantificadas as células CD4⁺ e CD8⁺, gerando uma contagem absoluta das subpopulações.

7. Quantificação absoluta da carga proviral (CPV) do HTLV-1

7.1. Cultivo e expansão da linhagem celular MT-2

A linhagem celular MT-2 é composta por linfoblastos isolados de indivíduo portador de ATLL (número de catálogo 93121518/ECACC). Esta linhagem celular contém o HTLV-1 integrado em seu genoma apresentando 2,1 cópias virais/célula (Albrecht et al., 1998), e expressa a proteína Tax. Esta linhagem foi cultivada em garrafas de 15 cm² (Greiner Bione, Frickenhausen, Baden-Württemberg, Alemanha) com 15 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF) (Hyclone, Logan, Utah, EUA), 100U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina. As células foram mantidas a temperatura de 37°C, 5% de umidade relativa do ar até expansão das mesmas. Em seguida, as células foram coletadas em tubos de propileno de 15 mL e lavadas com PBS (1X) e contadas em câmara de Neubauer.

7.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Para a quantificação da CPV foi empregada a metodologia de PCR em tempo real (qPCR). Para tanto, utilizou-se o kit *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Fosters City, California – EUA). A mistura de reação foi constituída por: 5 µl do reagente *TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)*, 5 µM do *primer forward*, 5 µM do *primer foward* cada *primer* e 5 µM da sonda marcada com fluorocromo *FAM™* (Applied Biosystems, Fosters City, California – EUA). O desenho dos *primers* utilizados para o gene alvo está descrito na Tabela 2 (Miley et al., 2000). Para a reação do gene endógeno, utilizou-se 5 µl do reagente *TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)* e 0,5 µL de sonda para o gene da β -actina marcada com fluorocromo *FAM™* (Applied Biosystems, Fosters City, California – EUA) .

Para a construção da curva padrão foi utilizada a linhagem MT2 (item 3.6), que contém 2,1 cópias do gene *tax* por célula (Albrecht et al., 1998) . Dessa forma, após a extração e quantificação do DNA (item 3.4.2) de uma quantidade conhecida de células, foi possível realizar diluições seriadas com 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 cópias de gene/µL, respectivamente. Para a quantificação da CPV em pacientes foram utilizados 200 ng de DNA genômico na reação. Todas as diluições da curva padrão e as amostras dos pacientes foram testadas em duplicata.

A termociclagem na qual a amostra foi submetida constituiu-se de 1 ciclo de 50°C por 2 minutos, 1 ciclo de 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos/60°C por 1 minuto.

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados para a quantificação da carga proviral.

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

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

Durante a fase exponencial da amplificação, a curva se torna linear e o *cycle threshold* (Ct) pode ser estabelecido. Isso significa que a cada ciclo, o dobro de produto é formado e quando realizadas diluições seriadas são mantidas diferenças

proporcionais entre os Cts. Para a quantificação da CPV, as diluições foram seriadas na base 10 e os valores de Ct obtidos devem possuir uma diferença de aproximadamente 3,3 ciclos. Em decorrência dessa proporção foi construída a curva padrão por regressão linear para a média de amplificação dos genes β -actina e *tax*.

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

$$CPV = \frac{\text{nº de cópias de } tax}{\text{nº de cópias de } \beta - \text{actina}} \times 2 \times 10.000 \text{ células}$$

8. Isolamento de células CD4⁺

8.1. Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

As PBMCs dos indivíduos incluídos no estudo foram isoladas a partir de 40 mL de sangue total, utilizando-se o gradiente de densidade *Ficoll-Paque™ PLUS GE* (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala – Suécia). As amostras foram centrifugadas a 200 x *g* durante 10 minutos e o plasma foi removido. Este processo é importante para a eliminação de plaquetas que podem atrapalhar durante o processo de separação de linfócitos T CD4⁺ (Item 3.9). Após a remoção do plasma, as amostras foram diluídas 1:1 (v/v) em tampão salina fosfato (PBS) pH 7,5 (1X) em tubos propileno de 50 mL. Em seguida, foram adicionados, cuidadosamente, 15 mL de *Ficoll-Paque™* sob o sangue. Os tubos foram centrifugados a 500 x *g* durante 30 minutos e à temperatura ambiente para a obtenção da camada de PBMC. O anel formado na interface plasma-*Ficoll Paque™*, que continha as PBMC, foi cuidadosamente coletado e transferido para um novo tubo, lavado duas vezes com 30 mL de PBS (1X) e centrifugado a 200 x *g* durante 10 minutos. O *pellet* de PBMC foi ressuspensionado em 1 mL de PBS (1X) e contado em câmara de Neubauer. Ao final do processo, foram separadas 2x10⁷ células para a separação de linfócitos T CD4⁺ e o restante foi criopreservado em 1 mL de soro bovino fetal inativado (Hyclone, Logan Utah, EUA) contendo 10% DMSO (v/v) (Merck, Darmstadt, Hessen – Alemanha) em nitrogênio líquido, para posterior análise por citometria de fluxo.

8.2. Separação imunomagnética de linfócitos T CD4⁺

Os linfócitos T CD4⁺ foram isolados e selecionados positivamente em coluna imunomagnética LS (Miltenyl Biotec, Bergisch Gladbach - Alemanha) a partir de PBMCs. Para tal seleção, foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD4⁺ (Miltenyl 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 ressuspensas 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 1x10⁷ células foram utilizados 80 uL de tampão de coluna gelado e 20 uL de 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 ressuspensas em um volume final de 500 uL.

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 x *g* durante 10 minutos e ressuspensas 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, 0,4x10⁶ 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 uL de PBS contendo as células + 750 uL de *Trizol*®), para posterior extração de RNA.

8.3. 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 – EUA).

Para essas análises, foram utilizadas 3x10⁵ células para cada tubo de marcação. Os marcadores utilizados foram CD4-FITC e CD3-PE (marcadores de

linfócitos T CD4⁺), CD8-PercP e CD3-PE (marcadores de linfócitos T CD8⁺), CD19-PE (marcador de linfócitos B) e CD14-PE (marcados de monócitos). Um tubo controle foi incluído na análise. Em cada tubo contendo as células, 5 µL de anticorpo foram adicionados, e essa mistura foi incubada por 15 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 2 mL de PBS (1X) para lavagem dos anticorpos não ligados e os tubos foram centrifugados a 600 x *g* durante 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS (1X) para análise no citômetro.

Foram adquiridos pelo citômetro, 10.000 eventos e os dados obtidos foram plotados em função dos parâmetros *forward scatter* (FSC), que corresponde ao tamanho celular, e de *side scatter* (SSC), correspondente à complexidade granular da célula. Deste modo, uma região correspondente às células linfocíticas totais foi selecionada e as células marcadas com os anticorpos de interesse foram lidas gerando um gráfico de pontos (*dot plot*), no qual foi possível visualizar as células marcadas com os seus respectivos anticorpos. Amostras com pureza superior a 80% foram incluídas no estudo.

9. Extração e quantificação de RNA total

O RNA total foi extraído pelo método do *Trizol® Reagent* (Invitrogen, Carlsbad, California – EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Às células isoladas, foi adicionado 1 mL de *Trizol® Reagent* e 100 µg de glicogênio (USB, Cleveland, Ohio, EUA). A mistura foi homogeneizada e foi incubada durante 5 minutos a temperatura ambiente para dissociação nucleoprotéica. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha) seguido por agitação em vórtex durante 15 segundos e incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 12.000 x *g* a 4°C. Nesta etapa, a mistura é separada em uma fase inferior de coloração rosa, a fase fenol-clorofórmio; uma interface; e uma fase aquosa. O RNA permanece na fase aquosa, que foi transferida para um novo tubo.

O RNA foi precipitado com adição de 500 µL de isopropanol gelado (Merck, Darmstadt, Hesse, Alemanha) sobre a fase aquosa e posterior incubação a -80°C durante 2 horas. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12.000 x *g* durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 µL

de etanol 70% (v/v) e centrifugado a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Após a secagem, o RNA foi eluído em 20 µL de água nuclease *free*, e estocado a -80°C.

Por fim, o RNA foi quantificado e avaliado quanto à sua integridade e pureza por meio da análise em gel de agarose e leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A partir desse RNA total, será sintetizado o cDNA.

10. Validação da expressão dos miRNAs

10.1. Reação de transcrição reversa – miRNA

A quantificação da expressão de miRNAs por qPCR apresenta uma boa sensibilidade detectando, inclusive, a expressão de miRNAs semelhantes entre si e/ou da mesma família. Esta metodologia exige que se realize a transcrição reversa utilizando *primers stem-loop* RT-PCR específicos para cada miRNA de interesse.

Para a síntese do cDNA-miRNA foram utilizados os reagentes do kit *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia - EUA), 2,5 ng de RNA e 3,8 unidades de inibidor de RNase. O *random primer*® (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia – EUA) foi substituído pelo *stem-loop RT primer*® para cada miRNA maduro específico e as condições de ciclagem utilizadas foram: 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos.

10.2. Reação de Amplificação

A quantificação da expressão dos miRNAs foi realizado pela quantificação relativa utilizando-se qPCR. Será utilizado o kit *TaqMan® microRNA assays Human* (Applied Biosystems, Fosters City, California – EUA). A mistura de reação foi composta por: 5 µl de reagente *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (2X); 0,5 µl de sonda (20X) (específica para cada miRNA maduro e marcada com o fluorocromo FAM); 0,5 µl de água reagente estéril Tipo I e cDNA obtido no item anterior, diluído 1:4 (v/v). A normalização da reação foi feita pela quantificação dos RNAs nucleolares não-codificantes RNU24 e/ou RNU 28 utilizando o método de cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

A reação foi submetida aos ciclos de amplificação: um ciclo de 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos/60°C por 1 minuto. Todas as reações foram testadas em duplicatas.

11. Quantificação da expressão genes alvo dos miRNAs

11.1. Obtenção do cDNA

O RNA total foi transcrito utilizando-se o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied Biosystems, Foster City, California – EUA), segundo as instruções do fabricante, utilizando 1 µg de RNA total.

As amostras foram submetidas às condições de ciclagem: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos.

11.2. Reação de Amplificação

Após a transcrição, os cDNAs obtidos foram utilizados para as reações de PCR em tempo real, a fim de se quantificar a expressão de genes alvos, por meio do kit *TaqMan® Gene Expression Assays* (Applied Biosystems, Fosters City, California – EUA). A mistura de reação foi constituída por: 5 µl de reagente *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (2X); 0,5 µl de sonda (20X); 0,5 µl de água reagente estéril Tipo I e cDNA obtido no item anterior, diluído 1:10 (v/v). Os dados obtidos foram normalizados pela expressão dos genes endógenos GAPDH, β-actina e RPL13A utilizando o método de cálculo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e/ou unidades de expressão relativa (URE).

A reação foi submetida aos ciclos de amplificação: um ciclo de 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos/60°C por 1 minuto. Todas as reações foram testadas em duplicatas.

12. Ensaios de validação do gene alvo

Estes ensaios foram realizados no intuito de validar o gene alvo do miRNA. Para tanto, foi utilizada uma metodologia no qual se utiliza um vetor com expressão *downstream* de luciferase, o *pMIR-REPORT™ miRNA Expression Vector* (Ambion, Austin, Texas - EUA), e dessa forma pode-se avaliar a expressão do gene alvo.

12.1. Desenho dos oligonucleotídeos para clonagem em vetor de expressão

O desenho dos oligonucleotídeos utilizados para clonagem no vetor *pMIR-REPORT™ miRNA Expression Vector* (Ambion, Austin, Texas - EUA) foram desenhados a partir de uma região específica do gene no qual se liga o miRNA, a denominada 'região semente'. Essas regiões foram preditas utilizando o *algoritmo TargetScanHuman* (Bartel, 2009). O miRNA se liga na extremidade 3'UTR do gene, com complementaridade de 5-8 nucleotídeos. Dessa forma, essa região de ligação foi preservada no desenho dos oligonucleotídeos, e estes ficaram com um tamanho de 61 nucleotídeos cada, de acordo com o manual do fabricante do vetor.

Foram desenhados oligonucleotídeos para os genes interferon gama (*IFNG*), quinase associada ao receptor de interleucina-1 (*IRAK1*) e fator associado a receptor de TNF-6 (*TRAF6*) (Tabela 3). Esses oligonucleotídeos foram desenhados como fita simples, e com extremidades que permitem sua ligação ao vetor entre os sítios de restrição *SpeI* e *HindIII*. Essas moléculas passaram por um processo de anelamento subsequente, atentando-se à complementaridade de cada par.

Tabela 3. Sequências sintetizadas para clonagem no vetor *pMIR-REPORT™ miRNA Expression Vector*

Gene	Sequências
IFNG	5' CT AGT* CAA GGC TAT GTG ATT ACA AGG CTT TAT CTC AGG GGC CAA CTA GGC AGC CAA **A 3' 3' <u>A</u> * GTT CCG ATA CAC TAA TGT TCC GAA ATA GAG TCC CCG GTT GAT CCG TCG GTT **TTC GA 5'
IRAK1	5' CT AGT* CGG AAG TCA AAG TTC TCA TGG TCA GAA GTT CTC ATG GTG CAC GAG TCC TCA **A 3' 3' <u>A</u> * GCC TTC AGT TTC AAG AGT ACC AGT CTT CAA GAG TAC CAC GTG CTC AGG AGT **TTC GA 5'
TRAF6	5' CT AGT* CGA GAA GAG TTA TTG CTC TTG ATA GTT GAG TTC TCA TTT TTT TAA CCT GTT **A 3' 3' <u>A</u> * GCT CTT CTC AAT AAC GAG AAC TAT CAA CTC AAG AGT AAA AAA ATT GGA CAA **TTC GA 5'

Regiões sublinhadas: Sítio de enzimas de restrição **SpeI* ***HindIII*. Sequências em negrito: Região de ligação da sequência semente do miRNA

12.2. Anelamento dos oligonucleotídeos

Para a reação de anelamento, foram utilizados 2 µL (1 µg/µL) de cada oligonucleotídeo do par complementar e 46 µL de tampão de anelamento de DNA (30 mM HEPES pH 7,4; 100 mM de acetato de potássio; 2 mM de acetato de magnésio). A mistura foi aquecida a 90°C durante 5 minutos, e em seguida incubada a 37°C por 1 hora.

12.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os oligonucleotídeos fita dupla foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 12% para verificar o anelamento. Foi utilizado o corante *GelRed™* (Biotium, São Francisco, Califórnia, EUA) que se intercala em fitas duplas de ácidos nucleicos, permitindo a visualização do mesmo. Dessa forma, as bandas puderam ser purificadas para posterior clonagem em vetor. Os produtos do anelamento foram posicionados nos poços no gel e, em seguida, o mesmo foi submetido a uma voltagem de 80 V nos primeiros 20 minutos e 100 V durante 2 horas.

12.4. Purificação da banda de oligonucleotídeos de gel de poliacrilamida

As bandas obtidas do gel de poliacrilamida de tamanho aproximado de 60 pb foram purificadas utilizando uma coluna de acetato de celulose do kit *I-Sage Long kit* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia - EUA). A membrana presente na coluna, permite a remoção do DNA do gel de acrilamida. Para tanto, as bandas foram retiradas do restante do gel com a ajuda de um bisturi e trituradas dentro de dois tubo 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 150 µL da mistura LoTE/7,5 M de acetato de amônio (125:25 v/v) aos pedaços de gel de cada tubo e o homogenato foi incubado a 65°C durante 2 horas. A solução obtida foi transferida para a coluna *S.N.A.P™ column* e centrifugou-se a 18.000 x *g* durante 2 minutos. As frações eluídas foram coletadas de cada tubo e unidas, somando um total de ~300 µL de eluato. A essa fração, foram adicionados 133 µL de acetato de amônio, 3 µL de glicogênio e 1000 µL de etanol PA. A mistura final foi incubada no gelo durante 20 minutos e posteriormente centrifugada a 18.000 x *g* durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado. Após as lavagens, o *pellet* foi secado e ressuspenso em 14 µL de LoTE e armazenado a -20°C.

12.5. Linearização do vetor pMIR-REPORT e clonagem do gene alvo

O kit *pMIR-REPORT™ miRNA Expression Vector* (Ambion, Austin, Texas - EUA) possui um vetor controle e um vetor *reporter*. Este último contém um gene de luciferase sob o controle de um promotor, e uma região de clonagem do gene alvo

do miRNA *downstream* à sequência da luciferase, e o primeiro contém o gene da β -galactosidase, o qual normaliza a expressão da luciferase (Figura 4).

Figura 4. Mapa dos vetores *reporter* e controle do *pMIR-REPORT™ Expression Vector*

A clonagem dos insertos oligonucleotídeos referentes às regiões de ligação dos miRNAs foi realizada entre os sítios de restrição das enzimas *SpeI* e *HindIII*. Dessa forma, o vetor *reporter* foi linearizado utilizando-se essas duas enzimas. A reação foi realizada de acordo com as instruções do fabricante das enzimas (New England Biolabs, Ipswich, Massachussets - EUA). Em seguida, a mistura foi submetida a uma eletroforese de agarose 1% para visualização da digestão, e purificação do vetor aberto.

Os insertos de *IFNG*, *IRAK1* e *TRAF6* foram clonados no vetor utilizando-se o kit *T4 DNA ligase* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia - EUA), nas seguintes condições: 4 μ L de tampão de ligação 5X; 50 fmol do inserto; 150 fmol do vetor e 1 unidade da enzima T4 DNA ligase. A mistura foi incubada a 14°C por 16 horas.

Em seguida, a mistura passou por um processo de precipitação para eliminação de sais e outros contaminantes, a qual se processou da seguinte forma: $\frac{1}{2}$ volume de NH_4Ac 7,5 M, pH 5,2 e 2,5 volumes de etanol absoluto gelado. A mistura foi agitada em vortex e deixou-se precipitando *overnight* a -20°C. No dia seguinte, o sistema passou por uma centrifugação a 12.000 g por 15 minutos, e o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 75% gelado, e em seguida, ressuspenso em 20 μ L de água nuclease *free* e quantificadas por meio de

espectrofotometria (UV) (Nanodrop 2000c spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Delaware - EUA) em comprimento de onda de 260 nm e 280 nm.

12.6. Transformação bacteriana com os vetores *reporter* e controle

Os vetores controle e *reporter* obtidos no passo anterior foram transformados em bactérias *E. coli* quimicamente competentes da linhagem DH10 β . Essas bactérias (120 μ L) foram colocadas em um tubo juntamente com 20 ng do DNA. O sistema foi incubado no gelo por 30 minutos e posteriormente colocado a 42°C por 1 minuto para depois voltar ao gelo (choque térmico) por mais 5 minutos. Em seguida, foram acrescentados 300 μ L de meio S.O.C. (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia - EUA) e os sistemas foram incubados a 37°C por 1 hora sob agitação (200 rpm). Os produtos das transformações foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultura LB ágar e ampicilina (concentração final: 0,1 μ g/ μ L) e incubadas a 37°C por 18 horas. Após esse período, observou-se o crescimento de várias colônias de coloração branca na placa de Petri. Em seguida, as colônias de cada placa foram submetidas à expansão, separadamente em tubos de polipropileno contendo 5 mL de meio LB líquido com ampicilina na concentração de 100 μ g/mL, em agitador automático a 37°C, 200 rpm, *overnight*.

12.7. Extração de DNA plasmidial

Após os processos de transformação e expansão, os clones obtidos foram submetidos à extração de DNA plasmidial com o uso do kit *S.N.A.P. miniprep* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA). Os tubos de polipropileno contendo 5 mL de meio LB líquido com as bactérias transformadas foram submetidos a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e a extração foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. O *pellet* celular foi ressuspensão com 150 μ L do tampão de ressuspensão seguido de 150 μ L de tampão de lise e, em seguida, a mistura foi homogeneizada por inversão e incubada a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente, foram adicionados 600 μ L de tampão de ligação à mistura, homogeneizou-se e a mesma foi transferida para a coluna S.N.A.P Miniprep Column acoplada ao tubo coletor. A coluna foi centrifugada 3000 X *g* durante 30 segundos. O eluato foi descartado e à coluna foram adicionados 900 μ L de tampão de lavagem 1X. A mesma foi centrifugada a velocidade máxima por 1 minuto. Para o passo de

eluição, foram adicionados 60 µL de água nucleasse *free* e a coluna foi incubada a temperatura ambiente durante 3 minutos. Por fim, deu-se mais um passo de centrifugação a velocidade máxima durante 30 segundos.

12.8. Sequenciamento dos clones *reporter*

Os vetores foram submetidos à reação de sequenciamento com o *Big Dye® Terminator V3.1 Cycle sequence kit* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), nas seguintes condições: 1 µL de DNA plasmidial, 1 µL dos primer 5' – AGGCGATTAAGTTGGGTA - 3', 2 µL de *BigDye® Terminator v1.1/3.1 Sequencing buffer* (5X), 2 µL de *Terminator Ready Reaction Mix* e 4 µL de água deionizada. O sistema foi submetido às seguintes temperaturas no termociclador: 96 °C por 1 minuto, e 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. As reações foram precipitadas e submetidas ao sequenciador automático *3500xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). As sequências foram analisadas utilizando o *software BioEdit* (versão 7.0.5.3).

12.9. Transfecção das células HEK-293T com os vetore

12.9.1. Cultivo das células da linhagem HEK-293T

A linhagem celular HEK 293 é constituída de células renais embrionárias humanas transformadas com adenovírus (número de catálogo CRL-1573™/ATCC). As mesmas foram cultivadas em meio DMEM (Gibco, Carlsbad, Califórnia, EUA) suplementado com 10% (v/v) de SBF (Hyclone, Logan, Utah, EUA), 100U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina. As células foram mantidas a temperatura de 37°C, 5% de umidade relativa do ar até atingirem confluência de aproximadamente 70%.

12.9.2. Transfecção das células

No dia anterior ao da transfecção, foram plaqueadas 2×10^5 células HEK-293T por poço em placas de 24 poços. As células foram incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por aproximadamente 18 horas para atingirem uma confluência de 60-80%.

Para o processo de transfecção, foram utilizados 250 ng de cada vetor *reporter* clonado com o gene específico, 250 ng do vetor controle num volume final de 50 µL de meio DMEM sem soro bovino fetal (SBF) para cada poço com células. A mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 2,5 µL de Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), e manteve-se o sistema em temperatura ambiente durante 20 minutos, e 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SBF foi acrescentado logo em seguida. Essa mistura contendo os complexos de DNA-Lipofectamina, foi adicionada à cada poço contendo células HEK-293T. O meio de cultura foi trocado após 4-6 horas.

A leitura da atividade de luciferase foi realizada 24 horas após a transfecção. Adiciona-se o substrato da luciferase, a luciferina, para avaliar a atividade da enzima. Os sinais de luminescência foram avaliados pelo IVIS® Lumina II (Caliper Life Sciences, Hopkinton, Massachusetts – EUA).

12.10. Sequenciamento dos vetores de expressão pMIR-Report™ miRNA Expression Vector System

Os vetores que demonstraram positividade de luciferase por meio da leitura em luminômetro foram submetidos à reação de sequenciamento com o kit *Big Dye® Terminator V3.1 cycle sequence kit* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA), nas seguintes condições: 1 µL de DNA plasmidial, 1 µL dos *primers* pmiR-Report For e pmiR-Report Rev (Tabela 4), 2 µL de *BigDye® Terminator v1.1/3.1 Sequencing buffer* (5X), 2 µL de *Terminator Ready Reaction Mix* e 4 µL de água deionizada. O sistema foi submetido às seguintes temperaturas no termociclador: 96 °C por 1 minuto, e 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. As reações foram precipitadas e submetidas ao sequenciador automático *3500xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). As sequências foram analisadas utilizando o software BioEdit (versão 7.0.5.3).

Tabela 4. Primers para sequenciamento dos vetores.

Primer	Sequência 5' – 3'	Tm (°C)
pmiR-Report For	AAA TAC CGC ACA GAT GCG TAA	64,1
pmiR-Report Rev	GGA TTA CGT CGC CAG TCA AG	64,5

13. Ensaio funcional

13.1 Cultura de células da linhagem MT-2

Os ensaios funcionais dos miRNAs foram realizados na linhagem celular infectadas pelo HTLV-1, denominada MT2 (item 6.1).

13.1. Padronização da transfecção dos miRNAs miméticos (pré-miRs) em células MT-2

13.1.1. Padronização do reagente de transfecção

Para o estabelecimento do protocolo de transfecção de pré-miRs em células da linhagem MT2, inicialmente foram utilizados os reagentes lipídicos *Turbofect™ Transfection Reagent* (Fermentas, Burlington, Ontário, Canadá), *Lipofectamine™ 2000 Reagent* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent* (Roche, Basel, Suíça) e *SuperFect® Transfection Reagent* (QIAGEN, Hilden, Alemanha).

A fim de avaliar a taxa de transfecção, os pré-miR-125b-1-1 e pre-miR-146a (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) foram marcados com uma sonda cianina, Cy3, a qual emite uma fluorescência na faixa de comprimento de onda do amarelo-verde (excitação em ~550nm e emissão em ~570nm). Dessa forma, pode-se avaliar a emissão de fluorescência nas células transfectadas por meio de citometria de fluxo. Para tanto, foi utilizado o kit *Silencer® siRNA Labelling Kit – Cy™3* (Ambion, Autin, Texas, - EUA). A preparação da mistura para marcação foi composta por: 18,3µL de água reagente estéril Tipo I, 5µL tampão de marcação, ~5ug do pré-miR e 7,5µL do reagente de marcação Cy3. A mistura foi incubada a 37°C e ao abrigo da luz durante 60 minutos. Todas as transfecções foram realizadas em placas de 24 poços.

Para a padronização da transfecção, foram utilizadas as instruções dos fabricantes de cada reagente. Para tanto, uma determinada quantidade (Tabela 6) do pré-miR-125b-1-1 marcado foram diluídos em 100 µL de meio RPMI 1640 sem soro. Em seguida, foram adicionados os reagentes de transfecção (tabela 5) e incubou-se a mistura durante 20 minutos ao abrigo da luz. Ao final deste tempo, os

lipossomos foram adicionados gota a gota a 1 mL de meio contendo 1.10^6 células MT-2. As células foram incubadas a 37°C em ambiente de 5% de CO₂ por 2 horas. 24 horas

Tabela 5. Reagentes lipídicos utilizados na transfecção de células MT2.

Reagente	Volume*	Número de células/poço
<i>Turbofect™ Transfection Reagent</i>	2 µL	1×10^6
<i>Lipofectamine™ 2000 Reagent</i>	2 µL	5×10^5
<i>X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent</i>	2 uL	1×10^6
<i>SuperFect® Transfection Reagent</i>	4 µL	1×10^6

*Volume utilizado durante a transfecção

13.1.2. Padronização da quantidade de RNA

A fim de aumentar a taxa de transfecção de pré-miRNAs nas células MT2, foram feitos vários testes com concentrações diferentes de pré-miR-125b-1-1 e pré-miR-146a e do reagente *Turbofect™ Transfection Reagent*. O protocolo de transfecção foi realizado de acordo com item anterior. Foram testadas diferentes concentrações de reagente e pré-miR, variando de 2 a 5 µL e 30 a 200 nM, respectivamente. As combinações destes está descrito na Tabela 6.

Tabela 6. Relação de quantidade de Turbofect™ Transfection Reagent e concentração de pré-miRNAs em cada teste.

Teste	Quantidade de reagente	Concentração de pré-miR (nM)
1	2	100
2	2	50
3	2	150
4	4	200
5	4	100
6	5	100
7	2	30
8	2	50
9	3	30
10	3	50
11	4	70
12	4	100

13.1.3. Padronização do tempo de incubação

As células MT2 foram transfectadas de acordo com os itens anteriores e foram mantidas em incubadora 37°C, 5% CO₂ durante 2, 5, 8 e 12 horas.

14. Transfecção do pré-miR em células MT-2

As transfecções dos pré-miR-125b-1-1 e do miR-146a foram realizadas utilizando um gradiente desses RNAs a fim de avaliar o efeito nos genes alvo.

As transfecções foram realizadas de acordo com os itens anteriores. Dessa forma, 30, 50, 70 e 100 nM do pré-miR diluídos em 100 µL de meio RPMI 1640 sem soro, foram incubados com 3 µL do reagente *Turbofect™ Transfection Reagent* durante 20 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, a mistura foi adicionada a 1.10⁶ células MT-2, as quais foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 48 horas.

14.1. Quantificação da expressão dos genes alvo e dos genes de miRNAs nas células MT2 transfectadas

14.1.1. Quantificação dos miRNAs

Os miRNAs foram quantificados de acordo com os itens 10.1 e 10.2.

14.1.2. Quantificação dos genes alvo

Os genes alvo foram quantificados de acordo com os itens 11.1 e 11.2.

14.2. Extração e quantificação das proteínas das células MT-2 transfectadas

14.2.1. Extração das proteínas totais

As proteínas totais das células transfectadas com os pré-miRs foram extraídas utilizando-se o tampão de extração de proteínas RIPA (Cell Signaling, Boston, Massachusetts, EUA). A adição do tampão permite uma eficiente lise celular e solubilização protéica, evitando a degradação das mesmas mantendo sua atividade biológica. Às células MT-2 (1.10^6 células) foram adicionados 75 μ L de tampão RIPA e congeladas a -80°C *overnight*.

As células foram descongeladas e passaram pelo processo de sonicação durante 5 minutos intercalados com 5 minutos de gelo. Esse passo foi repetido 3 vezes. As amostras foram centrifugadas a $18.000 \times g$ durante 30 minutos. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e armazenado a -80°C .

14.2.2. Quantificação das proteínas totais

A quantificação das proteínas totais foi realizada em microplacas utilizando o kit *BCA Protein Assay Kit*[®] (Pierce, Rockford, Illinois – EUA), conforme especificações do fabricante. Para a construção da curva-padrão realizou-se diluição seriada a partir de uma solução-padrão fornecida com o kit, composta por BSA 2 mg/mL. Foram utilizadas as seguintes concentrações: 2 mg/mL; 1 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25

mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,625 mg/mL. O procedimento consistiu pipetar em cada poço as soluções em duplicata: 10 µL de cada diluição da curva-padrão; 10 µL de amostra; 10 µL de solução SDS a 1% (utilizada como branco). Em seguida, foram adicionados 200 µL de BCA-W[®] em cada poço. A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos e posteriormente resfriada em gelo. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 562 nm e o leitor de microplacas utilizado foi *VersaMaxPLUS*[®] (MDC, Sunnyvale, Califórnia – EUA).

14.2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A análise das proteínas IFN- γ , TRAF6 e IRAK1 de células MT2 transfectadas foi realizada pela metodologia de *Western Blotting*, seguindo-se os protocolo descrito por Sambrook et al., 1989.

Inicialmente foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS para separação das proteínas por meio do peso molecular, empregando 15 µg das amostras de proteína total, e utilizou-se um gel de resolução de 12% e um gel de empacotamento de 5%. O preparo destas amostras para aplicação no gel de poliacrilamida foi realizados por meio da adição de 5 µL de tampão de amostra, seguido por aquecimento a 100°C por 5 minutos. – Tampão de amostra: Tris-HCl 187 mM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia – EUA), SDS a 2% (m/v) (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri – EUA), azul de bromofenol a 1,0% (m/v) (Sigma-Chemical, Saint Louis, Missouri – EUA), glicerol a 27% (v/v) (Merck, Darmstadt, Hessen – Alemanha); β -mercaptoetanol a 5% (v/v) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri – EUA); água estéril tipo I (q.s.p. 10 mL). Após o preparo, as amostras e 6 µL do marcador de peso molecular *Kaleidoscope Prestained Standards*[®] (BioRad Laboratories, Hercules, Califórnia – EUA) foram aplicados no gel e submetidos à eletroforese em tampão de corrida Tris-Glicina (1X) a 80 V nos 30 minutos iniciais e 100 V por aproximadamente 2 horas. – Tampão Tris-Glicina: Tris 2,5 mM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California – EUA); Glicina 19,2 mM (USB, Cleveland, Ohio – EUA); SDS a 0,1% (m/v) (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri – EUA); água estéril tipo I (q.s.p 1 L); pH 8,4.

14.2.4. Western Blotting

A transferência das proteínas do gel de poliacrilamida para a membrana de PVDF *Hybond-P*[®] (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire - Inglaterra) ativada, foi realizada em tampão de transferência a 0,3 mA durante 2 a 14 horas a 4°C. – Tampão de transferência: Tris 25 mM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia – EUA); glicina 19,2 mM (USB, Cleveland, Ohio, EUA); metanol 20% (Merck, Marmstadt, Hessen – Alemanha), água estéril tipo I (q.s.p. 1 L); pH 8,3.

Ao final da transferência, a membrana foi corada com solução de Ponceau S e o gel com Coomassie blue, para avaliar a eficiência do processo.

Após o passo de coloração da membrana, a mesma foi descorada com solução de TBS-T. Em seguida, foi realizado o bloqueio da membrana com leite em pó desnatado 5% em TBS-T, durante duas horas em agitação constante. – TBS-T: Tris 10 mM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia – EUA); cloreto de sódio padrão analítico 150 mM (Merck, Marmstadt, Hessen – Alemanha); Tween-20[®] a 0,1% (v/v) (USB, Cleveland, Ohio, EUA); água estéril tipo I (q.s.p. 1 L); pH 7,5.

Ao final do bloqueio da membrana, foi realizada a incubação da mesma com os anticorpos primários (Cell Signaling, Boston, Massachusetts, EUA). Para a diluição dos anticorpos primários, foram utilizados os diluentes de acordo com a Tabela 4, adicionando-se 0,02% de azida sódica. O tempo de incubação para cada anticorpo também consta na Tabela 7. O anticorpo contra a β -actina foi utilizado como proteína endógena para normalização da expressão da proteína alvo.

Tabela 7. Características dos anticorpos primários.

Anticorpo	PM	Diluyente	Diluição	Tempo _{incub}	Isotipo
IFN- γ	17 kDa	Leite desnatado 5% TBS-Tween	1:1000	16h	Mouse IgG1
TRAF6	60kDa	BSA 5% TBS-Tween	1:1000	16h	Rabbit IgG
IRAK1	105kDa	BSA 5% TBS-Tween	1:1000	16h	Rabbit IgG

Após o tempo de incubação dos anticorpos primários, foram realizadas lavagens sucessivas na membrana com TBS-Tween, de 15, 10 e 5 minutos. Em seguida, procedeu-se com a incubação do anticorpo secundário. A escolha do anticorpo secundário é dependente do isotipo do primário (Tabela 4). O tempo de incubação da

membrana foi de uma hora, e foram realizadas lavagens sucessivas com TBS-Tween de 15, 10 e 5 minutos para retirada do anticorpo não ligado. Ao anticorpo secundário é ligada uma enzima peroxidase, a qual será responsável pela produção de quimiofluorescência após o contato com o seu substrato. Dessa forma, foi utilizado o kit *ECL Plus Western Blotting Detection System* (GE HealthCare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire – Inglaterra) para ativar a enzima. As soluções de detecção A e B foram misturadas a uma razão de 40:1 e esta mistura foi pipetada na superfície protéica da membrana de PVDF e incubada durante 5 minutos. A visualização do sinal de quimiofluorescência foi realizada no fotodocumentador ImageQuant™ 350 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia).

14.3. Quantificação da expressão das proteínas

A quantificação da expressão das proteínas foi realizada por densitometria das bandas obtidas do Western Blotting. Para tanto, foi utilizado o *software* de processamento de imagens ImageQuant TL (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Este *software* converte as imagens das bandas em histogramas. Áreas retangulares são definidas ao redor de cada banda para obtenção da densidade ótica total. Os retângulos são usados para definir as linhas de base, que são subsequentemente subtraídas da densidade ótica total. A quantificação da densidade é realizada por quantificação do volume de pixels obtidos na foto. Dessa forma, o *software* fornece dados de volume que são utilizados para calcular a expressão da proteína.

A expressão final da proteína é quantificada pela cálculo da razão entre o volume da proteína de interesse pelo volume da proteína endógena.

15. Análises estatísticas

Os dados obtidos nas análises de expressão gênica e protéica foram analisadas pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney, considerando-se significativos quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

As análises de correlação entre as expressões gênicas dos genes e CPV foi realizada utilizando-se o teste de correlação não-paramétrico de Spearman e foram consideradas significativas quando o p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$).

O *software GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Califórnia, EUA) foi utilizado em todas as análises estatísticas.

Resultados

IV. RESULTADOS

1. Caracterização dos indivíduos infectados pelo HTLV-1

Para a realização deste trabalho, foram coletadas amostras de 78 indivíduos divididos em três grupos: 28 indivíduos sadios (CT), 27 portadores assintomáticos do HTLV-1 (HAC) e 23 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 à idade. No grupo CT, dos 28 indivíduos, 20 eram do sexo feminino (71,4%) e 8 do sexo masculino (28,6%). Dos 27 pacientes HAC, 14 eram do sexo feminino (51,9%) e 13 do sexo masculino (48,1%); e dos 23 pacientes com HAM/TSP, 17 eram do sexo feminino (73,9%) e 6 do sexo masculino (26,1%) (Tabela 8). No geral, dos 50 indivíduos infectados pelo HTLV-1 incluídos neste estudo, 31 eram do sexo feminino (62,0%) e 19 do sexo masculino (38,0%). As idades nos três grupos variaram de 20 a 76 anos, com 53,8% de indivíduos na faixa etária acima dos 50 anos (Tabela 8). A média de idade dos indivíduos que compuseram o grupo CT, HAC e HAM/TSP foi de 46,5 (22-76 anos), 42,9 (20-72 anos) e 54,9 anos (37-74 anos), respectivamente.

Tabela 8. Caracterização dos indivíduos sadios e infectados pelo HTLV-1 em relação à idade e sexo.

Idade e Sexo	CT	HAC	HAM/TSP
18 – 29	4	4	0
30 – 39	5	7	1
40 – 49	6	4	5
> 50	13	12	17
Feminino	20	14	17
Masculino	8	13	6
Total	28	27	23

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.

A contagem de leucócitos variou entre 2.800 e 10.900 células/mm³, e a maioria (91%) das amostras apresentou-se dentro do valor de referência (4.000 a 11.000 células/mm³). Entretanto, sete amostras estavam abaixo destes valores (CT07, CT08, HAC20, HAM03, HAM06, HAM09 e HAM26).

A contagem de células CD4⁺ variou de 307 a 2.497 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, seis amostras tiveram valores inferiores (CT16, CT37, CT40, HAM11, HAM22 e HAM26).

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 apresentados).

As células CD4⁺ foram isoladas por coluna imunomagnética e a pureza dessas células foi avaliada por citometria de fluxo como observado na Tabela 9, todas as amostras apresentaram pureza acima de 87%. Este dado serviu como critério para inclusão das amostras neste estudo.

Tabela 9. 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	5.500	643	314	2,05	97.56
CT 03	F	56	4.100	736	532	1,38	97.74
CT 04	F	76	5.900	1138	593	1,92	98.10
CT 05	F	47	10.700	ND	ND	ND	97.42
CT 06	M	37	6.800	1007	621	1,62	97.71
CT 07	M	48	3.900	979	723	1,35	96.00
CT 08	F	36	3.100	867	415	2,09	94.65
CT 09	F	26	7.200	902	606	1,49	94.50
CT 10	F	54	8.700	2087	423	4,94	95.66

Clínica	Sexo	Idade	Contagem Global	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Razão CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Pureza CD4 ⁺ (%)
CT 11	M	32	9.600	896	597	1,50	88.66
CT 12	M	58	6.400	1063	692	1,54	96.42
CT 14	M	28	8.000	1178	273	4,32	95.23
CT 15	F	29	8.100	736	587	1,25	93.59
CT 16	M	58	8.000	1163	1385	0,86	89.70
CT 23	F	52	6.200	2314	755	3,06	96.71
CT 24	F	61	8.400	1202	433	2,78	92.39
CT 33	F	22	6.700	1500	950	1,58	96.57
CT 35	F	51	8.000	773	280	2,76	96.69
CT 36	F	55	7.800	943	346	2,73	87.56
CT 37	F	60	6.300	743	748	0,99	92.56
CT 38	F	49	5.400	1169	412	2,84	97.89
CT 39	F	43	10.900	1548	445	3,48	95.86
CT 40	M	47	6.000	307	261	1,18	95.28
CT 41	F	54	8.500	802	389	2,06	96.57
CT 42	F	49	8.100	893	359	2,49	94.73
CT 43	M	35	8.800	1448	890	1,73	ND
CT 45	F	54	6.500	1055	633	1,67	ND
CT 46	F	32	8.700	1504	364	4,13	ND
HAC 01	F	55	5.900	1204	650	1,85	95.63
HAC 03	F	50	ND	ND	ND	ND	98.62
HAC 04	M	38	6.500	ND	ND	ND	97.70
HAC 05	M	30	6.200	1568	901	1,74	93.46
HAC 06	M	35	9.600	1223	575	2,13	92.84
HAC 08	F	26	5.600	1251	760	1,65	96.87
HAC 09	F	47	5.900	676	512	1,32	95.81
HAC 10	F	24	8.000	690	341	2,02	96.26
HAC 11	M	38	6.400	1299	538	2,41	96.72
HAC 12	F	36	10.100	958	315	3,04	97.22
HAC 13	F	42	8.800	750	552	1,36	92.39
HAC 15	M	53	5.800	1142	1120	1,20	89.19
HAC 16	F	55	7.100	708	237	2,98	95.22
HAC 17	F	57	5.000	1277	545	2,34	95.04
HAC 18	F	22	5.700	892	617	1,45	94.58
HAC 19	F	33	4.800	1166	274	4,26	95.02
HAC 20	M	45	3.200	720	369	1,95	93.83
HAC 21	M	48	6.700	327	147	2,22	96.69
HAC 22	M	61	6.100	766	357	2,14	96.12

Clínica	Sexo	Idade	Contagem Global	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Razão CD4 ⁺ /CD8 ⁺	Pureza CD4 ⁺ (%)
HAC 24	F	61	5.800	984	677	1,45	97,60
HAC 25	M	72	9.200	1117	545	2,05	97,03
HAC 27	M	36	7.700	1452	901	1,61	96,84
HAC 28	F	27	7.100	1477	904	1,63	97,53
HAC 29	M	20	9.600	676	376	1,80	96,79
HAC 30	F	53	6.900	1353	907	1,49	96,27
HAC 31	F	53	6.700	1223	282	4,34	98,44
HAC 32	M	52	6.300	1701	644	2,64	97,58
HAC 33	M	50	8.100	452	1043	2,31	96,90
HAM 01	F	55	6.000	717	378	1,90	94,94
HAM 02	F	37	6.500	1906	423	4,51	98,63
HAM 03	F	74	3.600	1265	477	12,65	93,84
HAM 04	F	46	6.200	1310	326	4,02	96,65
HAM 05	F	61	7.100	2497	1001	2,49	92,36
HAM 06	F	58	2.800	1221	711	1,72	98,26
HAM 07	F	56	5.800	1259	393	3,20	93,77
HAM 08	M	47	8.200	ND	ND	ND	98,26
HAM 09	M	64	3.700	468	355	1,32	96,31
HAM 10	F	61	9.200	1084	237	4,57	98,24
HAM 11	M	48	5.300	2057	1864	1,10	96,49
HAM 12	F	53	10.600	1760	1101	1,60	96,70
HAM 13	F	49	6.800	728	556	1,31	95,70
HAM 14	F	61	6.000	665	256	2,6	93,82
HAM 15	F	62	6.100	919	402	2,29	96,45
HAM 16	M	55	9.800	1209	721	1,68	91,29
HAM 17	F	55	8.600	579	272	2,13	93,62
HAM 21	F	57	8.000	876	570	1,54	97,50
HAM 22	F	48	9.900	577	576	1,00	94,97
HAM 24	F	52	6.200	1679	301	5,58	ND
HAM 25	M	51	5.800	786	327	2,41	ND
HAM 26	M	60	3.400	940	809	1,16	98,56
HAM 27	F	57	4.300	816	441	1,85	87,25

F: feminino. M: masculino. CT: indivíduos sadios. HAC: indivíduos assintomáticos. HAM: indivíduos com HAM/TSP. Valores normais: Leucócitos totais de 4.000 a 11.000 células/mm³; CD4⁺: maior que 500 células/mm³; CD8⁺ de 400 a 1.200 células/mm³; razão maior que 1,2. ND: não determinado.

3. Quantificação da carga proviral (CPV)

As amostras dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 foram avaliadas por qPCR para a quantificação da CPV nas células mononucleares de sangue periférico.

A quantificação da CPV foi realizada em nove indivíduos assintomáticos e em 13 indivíduos que apresentam HAM/TSP, representados na Tabela 10. A média da CPV dos indivíduos HAC foi de 1.074,57 cópias virais/ 10^5 células, enquanto que para os pacientes com HAM/TSP foi de 5.733,96 cópias virais/ 10^5 células.

Tabela 10. Determinação da CPV dos indivíduos infectados pelo HTLV-1.

Indivíduos infectados pelo HTLV-1			
Amostra	CPV	Amostra	CPV
HAC 01	177,19	HAM 02	4.780,76
HAC 03	1.788,86	HAM 03	10.654,74
HAC 05	1.336,81	HAM 04	11.144,75
HAC 06	667,89	HAM 05	8.881,14
HAC 09	503,52	HAM 06	1.651,25
HAC 10	152,83	HAM 07	9.388,30
HAC 11	3.215,56	HAM 08	10.914,49
HAC 18	637,18	HAM 11	3.599,68
HAC 27	1.191,31	HAM 12	1.734,05
		HAM 13	5.030,02
		HAM 16	4.739,8
		HAM 17	864,42
		HAM 20	958,05
Média	1.074,57	Média	5.733,96

A análise estatística foi realizada pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney e foi verificado um aumento de 5,33 vezes no grupo HAM/TSP quando comparado com o grupo HAC ($p=0,0021$) (Figura 5).

Figura 5. Distribuição da CPV (nº de cópias virais/ 10^5 células) entre os indivíduos assintomáticos (HAC) e HAM/TSP (HAM). Foi realizado teste não-paramétrico de Mann-Whitney. ** $p=0,0021$.

4. Seleção dos miRNAs por análise do painel de expressão em linfócitos T CD4⁺ e análise *in silico*

Para a confecção do projeto, foram utilizados os resultados anteriormente obtidos do painel de expressão de 160 miRNAs humanos realizado em nosso laboratório. A análise do painel de expressão gênica de miRNAs, utilizando-se linfócitos T CD4⁺ de indivíduos infectados pelo HTLV-1, foi realizada de forma a distinguir os miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos estudados. Foram feitos *pools* de seis amostras de linfócitos T CD4⁺ de cada grupo, os quais eram formados por um grupo controle, de indivíduos saudáveis (o qual será chamado de CT); de indivíduos portadores do HTLV-1 (HAC); e de pacientes com a mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM/TSP).

Dessa forma, foi obtida a expressão relativa dos miRNAs para os grupos HAC e HAM/TSP. Foram identificados um total de 56 miRNAs que se apresentam 1,5 vezes aumentados no grupo HAM/TSP (Tabela 11). Para o grupo HAC, apenas 10 miRNAs estão mais expressos (1,5 vezes) (Tabela 12).

Tabela 11. Expressão relativa (*fold change*) de miRNAs em células T CD4⁺ T isoladas de pacientes HAC e HAM/TSP - >1,5 vezes aumentada no grupo HAM/TSP.

microRNA	HAC	HAM/TSP	Mapa Genético	Organização
hsa-let-7a	0,61	3,69	9q22.32	cluster
hsa-let-7b	1,19	3,75	22q13.2	cluster
hsa-miR-103-2	1,33	5,63	20p13	cluster
hsa-miR-106a	0,87	3,55	Xq26.2	cluster
hsa-miR-107	4,50	9,99	10q23.31	single
hsa-miR-125a	4,02	10,26	19q12	single
hsa-miR-130b	1,76	9,41	22q11.21	single
hsa-miR-132	2,60	19,44	17p13.3	cluster
hsa-miR-140	2,55	5,00	16q22.1	single
hsa-miR-141	1,64	3,47	12p13.31	single
hsa-miR-142-3p	1,90	3,00	17q23.2	single
hsa-miR-146	1,63	4,22	5q33.3	single

microRNA	HAC	HAM/TSP	Mapa Genético	Organização
hsa-miR-150	1,64	5,58	19q13.33	single
hsa-miR-152	1,12	8,34	17q21.32	single
hsa-miR-15a	0,76	2,15	13q14.3	cluster
hsa-miR-15b	1,77	15,21	3q25.33	cluster
hsa-miR-16-1	3,18	7,07	13q14.3	cluster
hsa-miR-17-3p	1,61	6,05	13q31.3	cluster
hsa-miR-181c	0,76	1,81	19p13.13	cluster
hsa-miR-185	1,47	2,56	22q11.21	single
hsa-miR-186	0,62	1,03	1p31.1	single
hsa-miR-191	3,04	5,55	3p21.31	cluster
hsa-miR-194-1	0,60	1,16	1q41	cluster
hsa-miR-195	0,54	1,03	17p13.1	cluster
hsa-miR-197	2,09	4,60	1p13.3	single
hsa-miR-199a*	1,82	2,91	19p13.2	single
hsa-miR-20a	0,63	1,30	13q31.3	cluster
hsa-miR-200c	1,59	3,15	12p13.31	single
hsa-miR-21	0,96	1,91	17q23.1	single
hsa-miR-210	1,11	2,43	11p15.5	single
hsa-miR-23a	0,22	5,76	19p13.12	cluster
hsa-miR-23b	14,30	22,54	9q22.32	cluster
hsa-miR-25	1,33	4,44	7q22.1	cluster
hsa-miR-27a	1,66	8,10	19p13.12	cluster
hsa-miR-27b	1,72	4,43	9q22.32	cluster
hsa-miR-28	1,84	7,45	3q28	Single
hsa-miR-296	0,84	5,42	20q13.32	cluster
hsa-miR-29a	0,75	2,88	7q32.3	cluster
hsa-miR-29b-1	0,57	1,32	7q32.3	cluster
hsa-miR-29c	0,86	3,41	1q32.3	cluster
hsa-miR-301	2,05	3,40	17q22	single
hsa-miR-30a	1,42	8,86	6q13	cluster
hsa-miR-30b	1,61	8,79	8q24.22	cluster
hsa-miR-30c-2	4,55	20,96	6q13	cluster
hsa-miR-30d	1,51	6,80	8q24.22	cluster
hsa-miR-30e	2,42	5,97	1p34.2	cluster

microRNA	HAC	HAM/TSP	Mapa Genético	Organização
hsa-miR-320a	0,93	2,22	8p21.3	single
hsa-miR-324	0,61	1,23	17p13.1	single
hsa-miR-326	1,16	2,38	11q13.4	single
hsa-miR-328	0,74	2,99	16q22.1	single
hsa-miR-330	1,11	4,30	19q13.32	single
hsa-miR-331	1,04	3,90	12q22	single
hsa-miR-342	0,43	2,89	14q32.2	single
hsa-miR-34a	0,47	9,08	1p36.23	single
hsa-miR-92a-1	2,83	5,58	13q31.3	cluster
hsa-miR-99a	2,87	6,76	21q21.1	cluster

Tabela 12. Expressão relativa (*fold change*) de 10 miRNAs em células T CD4+ T isoladas de pacientes HAC e HAM/TSP - >1,5X aumentada no grupo HAC.

microRNA	HAC	HAM/TSP	Mapa	Organização
hsa-miR-125b-	3,40	1,32	11q24.1	single
hsa-miR-126	9,02	2,90	9q34.3	single
hsa-miR-17-5p	2,12	0,78	13q31.3	cluster
hsa-miR-26b	3,01	0,64	2q35	single
hsa-miR-199a-	3,96	1,63	19p13.2	single
hsa-miR-221	3,44	0,78	Xp11.3	cluster
hsa-miR-223	16,60	4,40	Xq11.2	single
hsa-let-7d	1,68	1,10	9q22.32	cluster
hsa-let-7i	3,46	2,27	12q14.1	single

A análise destes resultados permitiu a seleção desses miRNAs para validação por qPCR. A partir do painel de miRNAs foram selecionados o miR-let-7a, o miR-223, o miR-125b-1-1, miR-34a, miR-221, miR-26a e miR-17-5p, os quais estavam diferencialmente expressos entre os grupos HAC e HAM/TSP. Apenas o miR-34a estava com a expressão aumentada no grupo HAM/TSP, o restante estavam mais expressos no grupo HAC. Além disso, por análise da literatura, foi selecionado o miR-146a para avaliação da expressão em pacientes infectados pelo HTLV-1.

5. Validação da expressão dos miRNAs

Para validar a expressão dos miRNAs no painel, fizemos uso da metodologia de qPCR. Para tanto, foram utilizadas 31 amostras provenientes de indivíduos controle saudáveis, 15 de portadores assintomáticos do HTLV-1 e 12 de pacientes HAM/TSP. Todas as amostras foram submetidas à separação de células CD4⁺ por coluna imunomagnética, para isolamento dos linfócitos T CD4⁺, e a pureza do eluído foi avaliada por citometria de fluxo.

Após a qPCR, os dados obtidos foram utilizados para o cálculo do *fold change* ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Os RNAs nucleolares (RNU-44 e RNU-48) foram utilizados como controles endógenos, e o grupo controle como calibrador.

Foram observadas algumas diferenças significativas na expressão relativa de alguns dos miRNAs avaliados (Figura 6). Os miRNAs let-7a e miR-223 apresentaram expressão elevada no grupo HAM/TSP quando comparados com o grupo CT e ainda, o miR-let-7a apresentou esta elevada expressão quando comparado com o grupo HAC. O miR-125b-1-1 apresentou expressão significativamente maior no grupo HAC quando comparado com os grupos CT e HAM/TSP. O miR-26a apresentou um significativo aumento (aproximadamente 3 vezes) em sua expressão no grupo CT quando comparado com o grupo HAC. Interessantemente, apesar da média de expressão do grupo HAM/TSP ser alta, não houve diferença estatística entre os outros grupos estudados. Já a miR-34a apresentou uma significativa diminuição em sua expressão no grupo HAC quando comparado com os grupos CT e HAM/TSP.

A expressão do miR-146a não mostrou diferença significativa entre os grupos HAC e HAM/TSP no painel realizado anteriormente. No entanto, resolvemos quantificar a expressão desta molécula, uma vez que alguns trabalhos já haviam relatado a expressão alterada deste miRNA na infecção pelo HTLV-1 em pacientes com manifestações de ATLL (Pichler et al., 2008; Tomita et al., 2012). Após a quantificação do mesmo, foi observado que ocorre uma alteração na expressão deste miRNA entre os grupos CT, HAC e HAM/TSP. Há um aumento significativo nos indivíduos infectados, especialmente no grupo HAM/TSP, quando comparada a expressão com do grupo CT.

Somente dois miRNAs, miR-125b-1-1e miR-34a, corroboraram com os dados obtidos no painel realizado anteriormente. Os demais não demonstraram os mesmos níveis de expressão do painel, ou ainda, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados.

Figura 6. Expressão relativa dos miRNAs (A) let-7a, (B) miR-125b, (C) miR-146a, (D) miR-17-5p, (E) miR-221, (F) miR-223 (G) miR-26a e (H) miR-34a em amostras de linfócitos T CD4+ provenientes de indivíduos controle (CT), assintomáticos (HAC) e pacientes HAM/TSP (H HAM). Cada ponto exibido no gráfico representa um indivíduo. Os valores da expressão relativa foram obtidos a partir do método $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

6. Análise *in silico* para predição de alvos dos miRNAs

O critério para a seleção dos miRNAs para análise dos genes alvo, baseou-se tanto na validação por qPCR mencionada anteriormente, bem como na participação na patogênese da infecção pelo HTLV-1 (tanto dos genes alvo quanto dos miRNAs). Dessa forma, foram analisados quanto aos alvos os miR-125b-1-1e miR-146a. Apesar da expressão do miR-34a corroborar com o painel de miRNAs, este não foi selecionado para dar prosseguimento com os ensaios posteriores. A literatura revela que o miR-34a está altamente correlacionado com vias de oncogênese (Kasinski and Slack, 2012; Zhao et al., 2013), a qual não se encaixa no foco do trabalho realizado. Já os miRNAs miR-125b-1-1 e miR-146a estão correlacionados com vias de indução/modulação de respostas inflamatória e imunológica, que poderia estar associada com a patogênese da HAM/TSP.

A análise de alvos proporciona uma vasta seleção de possíveis genes alvo e Tabela 13 resume a pesquisa por genes alvos dos miRNAs miR-125b-1-1e miR-146a.

Tabela 13. Predição de genes alvo de miRNAs.

<i>miRNA</i>	<i>Gene</i>	<i>Gene</i>	<i>Nome oficial</i>
miR-125b-1-1	<i>TNF</i>	7124	Fator de necrose tumoral
	<i>IL16</i>	3603	Interleucina-16
	<i>IFNG</i>	3458	Interferon gama
miR-146a	<i>IRAK1</i>	3654	Quinase associada ao receptor de
	<i>TRAF6</i>	7189	Fator associado ao receptor de TNF-6
	<i>CASP7</i>	840	Caspase 7

O critério de seleção utilizados foram a função biológica dos genes na infecção pelo HTLV-1 por análise da literatura. O *IFNG* foi selecionado como gene alvo do miR-125b-1-1, uma vez que este gene é responsável pela produção de uma citocina importante no combate à infecções virais, e seu nível de expressão já foi relatado como alterado em pacientes HAM/TSP (Kuroda and Matsui, 1993; Montanheiro PA, 2009). Ainda, os genes *IRAK1* e *TRAF6* foram escolhidos como genes alvo do miR-146a por suas participações na via do NF-kB, importante na ativação de vários genes durante esta infecção viral (Bouzar and Willems, 2008; Tomita et al., 2012).

7. Quantificação dos genes alvo

A quantificação dos genes alvos selecionados foi realizada pela metodologia da qPCR utilizando o método de análise de Unidades de Expressão Relativa (URE).

Para a análise da expressão dos genes *IFNG*, *IRAK1* e *TRAF6* foram utilizadas 54 amostras, divididas em três grupos: 19 amostras do grupo CT, 18 do grupo HAC e 17 do grupo HAM/TSP. Após a realização da qPCR, a expressão do gene *IFNG* mostrou-se elevado 1,3 vezes no grupo HAC quando comparado ao grupo CT ($p=0,0075$); e 1,8 vezes no grupo HAM quando comparado ao grupo HAC ($p=0,0230$). Não houve diferença significativa entre os grupos CT e HAM/TSP.

Não foi observada diferença na expressão de *IRAK1* entre os três grupos.

Houve um aumento na expressão do gene *TRAF6* nos grupos HAM/TSP ($p=0,0159$) e HAC ($p=0,0166$) quando comparado com o grupo CT, de 15,7 e 1,5 vezes, respectivamente. Os gráficos de dispersão dos genes quantificados, bem como os p valores podem ser observados na figura 7.

Figura 7. Quantificação dos genes *IFNG* (A), *IRAK1* (B) e *TRAF6* (C) em amostras de linfócitos T CD4⁺ provenientes de indivíduos controle (CT), assintomáticos (HAC) e pacientes HAM/TSP (HAM). Cada ponto exibido no gráfico representa um indivíduo. Os valores da expressão relativa foram obtidos a partir de cálculos de Unidade de Expressão Relativa (URE). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Os valores de expressão obtidos anteriormente foram utilizados para correlacionar os genes com a CPV aplicando o teste de correlação de Spearman (Figura 8). Os resultados revelaram uma correlação positiva entre o gene *IFNG* e a CPV ($p=0,0268$). Não foi observada correlação entre a CPV e os genes *IRAK1* e *TRAF6*.

Figura 8. Correlação entre a expressão dos genes *IFNG*, *TRAF6* e *IRAK1* com a CPV (n° cópias virais/105 células). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de correlação de Spearman.

8. Validação dos genes alvo

8.1. Clonagem dos genes alvo em vetor de expressão

Uma vez observado os níveis de expressão dos miRNAs e seus genes alvo, os oligonucleotídeos referentes a estes genes alvo foram sintetizados para clonagem no vetor *reporter* do *pMIR-REPORT*, o qual expressa luciferase. O desenho dessas moléculas foi realizado com ajuda do *software* TargetScan que mostra a região de ligação do miRNA no gene alvo (Tabela 14).

Tabela 14. Região de ligação dos miR-146a e miR-125b-1-1 aos seus respectivos genes alvo.

Posição na região 3'UTR	Pareamento predito para região alvo (superior) e miRNA (inferior)
IFNG 249-255	5' . . . AAAUCCGGAAGUCAAGUUCUCA . . .
miR-125b-1-1	3' UUGGGUACCUUAAG--UCAAGAGU
IRAK1 39-45	5' . . . GUUCUCAUGGUCAGAAGUUCUCA . . .
miR-146a	3' UUGGGUACCUUAAGUCAAGAGU
TRAF6 472-478	5' . . . UGCUCUAGAAAGUUGAGUUCUCA . . .
miR-146a	3' UUGGGUACCUUAAGUCAAGAGU

Dessa forma, foram desenhados os oligonucleotídeos referentes aos genes alvo dos miR-146a e miR-125b-1-1, que podem ser visualizados na tabela 7. Os oligonucleotídeos foram desenhados na forma de fitas simples complementares, contendo a região de ligação da sequência semente do miRNA. Dessa forma, os mesmos passaram por um passo de anelamento, a fim de obter o oligonucleotídeo fita dupla, o qual seria utilizado na clonagem no vetor *pMIR-REPORT*. Após o anelamento, as amostras foram analisadas em gel de agarose 2,5%, extraídas e purificadas para clonagem subsequente (figura 9).

Figura 9. Eletroforese após anelamento dos oligonucleotídeos em gel de agarose 2,5%. PhiX: Marcador de peso molecular. 1: Oligonucleotídeos de IFNG anelados. 2: Oligonucleotídeos de IRAK1 anelados. 3: Oligonucleotídeos de TRAF6 anelados.

Para a realização do processo de clonagem dos insertos anelados foi necessária a linearização do vetor *reporter*. Para tanto, foram utilizadas as enzimas de restrição *SpeI* e *HindIII*, as quais permitem a abertura do vetor, liberando fragmentos de 62 pb e 6.376 pb, que podem ser visualizadas na figura 10.

Figura 10. Eletroforese do vetor *pMirReport* digerido com as enzimas de restrição *SpeI* e *HindIII* em gel de agarose 1%. DigLuc: Vetor reporter após processo de linearização. 1 Kb plus: Marcador de peso molecular.

8.2. Sequenciamento dos clones

Após a ligação individual dos insertos no vetor *reporter*, foi realizada a transformação de bactérias e foram selecionados 27 clones para extração do DNA plasmidial. Em seguida, foi realizado o sequenciamento de todos os clones obtidos após este processo. A Figura 11A mostra o sequenciamento parcial dos vetores. Os eletroferogramas obtidos foram analisados com o auxílio do *software* BioEdit (versão 7.0.5.3) e a Figura 11B representa a localização dos *primers* utilizados no sequenciamento.

Figura 11. Sequenciamento dos vetores pMIR-REPORT™ contendo os genes alvo. (A) Eletroferograma parcial representativo de um dos controles plasmidiais. A região sublinhada indica a presença do vetor *reporter*. (B) Localização dos *primers* de sequenciamento no vetor. Região sublinhada em **negrito**: *primers forward e reverse*, respectivamente. Região sublinhada: Região de clonagem das sequências sementes dos genes alvo.

8.3. Transfecção dos vetores em células HEK-293T

Concomitantemente ao sequenciamento, foi realizada a transfecção dos plasmídeos em células HEK293T, para a etapa de validação dos genes alvo. Esta técnica permite avaliar a expressão de luciferase do vetor *reporter*. Dessa forma, vetores *reporter* clonados com o gene *IFNG* foram transfectados em linhagens de HEK 293T, e a atividade da luciferase foi avaliada após 24 horas (Figura 12). De acordo com os resultados, apenas seis clones contêm o gene da luciferase, uma vez que nessas amostras foi possível observar a emissão de luminescência. Os clones que expressaram a proteína foram sequenciados novamente para verificar a presença da mesma, assim como do gene alvo.

Figura 12. Ensaio de atividade de luciferase. Os poços contêm células HEK 293T transfectadas com plasmídeos distintos contendo o vetor reporter com os genes *IFNG*, *IRAK1* ou *TRAF6*. A atividade foi mensurada após a adição de luciferina. Os poços iluminados indicam positividade para a enzima.

9. Ensaios funcionais

9.1. Padronização do processo de transfecção dos miRNAs miméticos em células MT-2

Em relação aos ensaios funcionais, foram feitos testes da transfecção dos pré-miRNAs nas células MT2, no intuito de padronizar os seguintes parâmetros: reagente, volume de reagente, concentração de RNA e tempo de incubação. Os resultados podem ser observados nas figuras a seguir (Figuras 13 a 17).

Inicialmente, foi realizada a avaliação da eficácia de transfecção a partir da análise de diferentes reagentes. Para tanto, foi realizado o ensaio de transfecção do pré-miR-125b-1-1 em células MT-2. Foram avaliados os reagentes *Turbofect™ Transfection Reagent* (Fermentas, Burlington, Ontário, Canadá), *Lipofectamine™ 2000 Reagent* (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), *X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent* (Roche, Basel, Suíça) e *SuperFect® Transfection Reagent* (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Foram utilizados 100 nM do pré-miR em cada teste e o protocolo utilizado foi realizado de acordo com as instruções de cada fabricante. Dentre os reagentes para transfecção testados, o Turbofect™ apresentou uma taxa de transfecção ~20% maior quando comparado com os outros reagentes (Figura 13).

Figura 13. Dot-plots da padronização dos reagentes lipídicos na transfecção de pré-miR-125b-1-1 em células MT2. 001. Dot-plot SSCxFSC de células MT2 não transfectadas. B a E: Dot-plots de CY3xSSC de células MT2 transfectadas com diferentes reagentes lipídicos.

Em seguida, foi padronizada a duração do processo de transfecção, ou seja, o tempo em que ocorre contato do lipossomo formado pelo reagente lipídico e o pré-miR, com a célula alvo. Após este tempo, o meio das células é trocado e ocorre a lavagem desse lipossomo, o que cessa a entrada de material genético. Entre tempos de 2, 5 e 8 horas não houve diferença significativa na taxa de células Cy3 positivas. No tempo após 12 horas, houve um aumento de 20% nessa taxa (Figura 14). No entanto, como as células são passíveis de morte ao reagente de transfecção, quanto maior o tempo de contato entre esses, maior a relação de células mortas na população celular. Dessa forma, foi estabelecido que as células ficassem em contato com o reagente apenas duas horas, e que nesse tempo o meio de cultura celular deve ser trocado, diminuindo assim a taxa de mortalidade.

Figura 14. Dot-plots da padronização do tempo de transfecção em células MT2. A: Dot-plot SSCxFSM de células MT2 não transfectada. B: Dot-plot Cy3xSSC de células MT2 não transfectadas. C a F: Dot-plots Cy3xSSC de células MT2 com diferentes tempos de transfecção. SSC:

Nesta sequência, foi otimizado o volume de reagente *Turbofect*TM utilizado a cada transfecção assim como a concentração de pré-miRs. O protocolo de transfecção permaneceu o mesmo, alterando apenas as quantidades destes reagentes a cada teste e esses valores podem ser observados na tabela 6, no item 13.1.2 da metodologia.

Após esta bateria de testes, definiu-se a condição ótima para a transfecção volume de 4 μ L do reagente lipídico *Turbofect*TM e 200 nM de pré-miRNA, uma vez que nessas condições pôde ser observada uma taxa de transfecção 43,9% de células Cy3 positivas, taxa essa maior que a dos outros testes (Figura 15).

Estabelecida essa concentração, foi avaliada a mortalidade das células nestas condições de transfecção. Foram observados 58,9% de morte celular após a transfecção de células MT2 nas condições estabelecidas anteriormente e 77,1% de células mortas em contato com apenas o reagente de transfecção (Figura 16). Entretanto, essas células foram deixadas em contato com o reagente durante as 48 horas do ensaio, o que pode ter levado a aumentar essa taxa de mortalidade. Além disso, a concentração do reagente poderia ser muito tóxica à célula, uma vez que contato apenas com o reagente levou à morte de 2/3 das células.

Figura 15. Dot-plots da padronização do volume de reagente e da concentração de pré-miR-125b-1-1. A: Dot-plot SSCxFSC de células MT2 não transfectada. B: Dot-plot Cy3xSSC de células MT2 não transfectadas. C: Teste 1 (2μL de Turbofect™ (TF) e 100nM de pré-miR-125b-1-1). D: Teste 2 (2μL e 50mM). E: Teste 3 (2μL e 150nM). F: Teste 4 (4μL e 200nM). G: Teste 5 (4μL e 100nM). H: Teste 6 (5μL e 100nM).

Figura 16. *Dot-plots* da padronização do volume de reagente e morte celular. A: Dot-plot SSCxFSC de células MT2 não transfectada. B: Dot-plot Cy3xSSC de células MT2 não transfectadas. C: Dot-plot Cy3xSSC na condição do teste 4 (4 μ L e 200nM). D: Dot-plot PIxSSC de células MT2 não transfectadas. E: *Dot-plot* PIxSSC de células MT2 em contato com 4 μ L do reagente Turbofect. F: *Dot-plot* PIxSSC de células MT2 transfectadas na condição do teste 4 (4 μ L e 200nM).

Para confirmar os testes anteriores, refizemos o teste de padronização das quantidades de reagente de transfecção e pré-miRs, utilizando concentrações diferentes destes. O volume de *Turbofect*TM e de pré-miR-125b-1-1 podem ser visualizados na Tabela 6, no item 13.1.2. Neste experimento, além de checar a taxa de transfecção de cada ensaio, quantificamos a morte celular em cada condição (dados não mostrados). Para aprimorar o ensaio, as células foram incubadas inicialmente por apenas duas horas com a mistura de reagente+pré-miR e, em seguida, o meio de cultura foi trocado. Por fim, foi estabelecido que a melhor condição de transfecção, ou seja, aquela em se observa a maior taxa de células Cy3 positivas e menor morte celular, 44,0% e 15,0% respectivamente (dados não apresentados), é a condição do teste 10 (3 μ L de *Turbofect*TM e 50 nM de pré-miR-125b-1-1).

Figura 17. Dot-plots da padronização do volume de reagente e da concentração de pré-miR-125b-1-1. A: Dot-plot SSCxFSM de células MT2 não transfectadas. B: Dot-plot Cy3xSSC de células MT2 não transfectadas. C: Teste 7 (2µL de Turbofect (TF) e 30nM de pré- miR-125b-1-1). D: Teste 8 (2µL e 50mM). E: Teste 9 (3µL e 30nM). F: Teste 10 (3µL e 50nM). G: Teste 11 (4µL e 70nM). H: Teste 12 (4µL e 100nM).

9.2. Transfecção dos pré-miRNAs em células MT-2

O processo de transfecção foi realizado de acordo com a padronização e em seguida o RNA total e as proteínas totais foram extraídas das células MT-2. O RNA total foi utilizado para síntese de cDNA para quantificação dos genes alvo e dos genes de miRNAs, por meio de qPCR e as proteínas foram quantificadas por meio de *Western Blotting*.

As transfecções realizadas utilizaram um gradiente crescente de pré-miR-125b-1-1 e pré-miR-146a, em que se esperaria um gradiente inverso dos genes alvo. Por meio da qPCR, observamos que esse padrão esperado foi atingido. Assim, enquanto há um aumento na concentração de miR-125b-1-1 nas células, ocorre uma

diminuição do seu gene alvo, o *IFNG*. Da mesma forma, ocorre após a transfecção do pré-miR-146a com o seu alvo, *IRAK1* (Figura 19).

Figura 18. Expressão relativa de dos miRNAs e seus genes alvo após a transfecção dos pré-miRNAs. Unidades de Expressão Relativa (URE) do miR-125b-1-1 e seu alvo, *IFNG* e de miR-146a e seus genes alvo *TRAF6* e *IRAK1* em diferentes concentrações de pré-miRs no processo de transfecção de células MT-2.

A análise das proteínas foi realizada por meio da metodologia de *Western Blot*, de acordo com Sambrook e cols (1989). A transferência das proteínas foi realizada para membrana PVDF e o gel foi corado com Ponceau S, como mostra as figura 20 e 21. A coloração do gel de poliacrilamida com Coomassie Blue também foi

realizada e mostrou que a transferência para a membrana de PVDF, apesar de bem sucedida, não havia sido total, uma vez que foi observada as mesmas proteínas da membrana no gel.

Figura 19. Eletroforese proteínas totais de células MT2 transfetadas com pré-miR-125b-1-1 em gel de poliacrilamida a 12%. Coloração Coomassie blue. (M) Marcador de peso molecular, (C1) Controle 1 (MT2); (C2) Controle 2 (MT2 + reagente de transfecção), (1) 30 nM do pré-miR-125b-1-1; (2) 50 nM do pré-miR-125b-1-1; (3) 70 nM do pré-miR-125b-1-1; (4) 100 nM do pré-miR-125b-1-1.

Figura 20. Eletroforese das proteínas totais de células MT2 transfetadas com pre-miR-146a em gel de poliacrilamida a 12%. Coloração Coomassie blue. M: Marcador, C1:Controle 1 (MT2), C2: Controle 2 (MT2 + reagente de transfecção), (1) 30 nM do pré-miR-146a; (2) 50 nM do pré-miR-146a; (3) 70 nM do pré-miR-146a; (4) 100 nM do pré-miR-146a.

Ao final do processo de Western Blotting, após a incubação das membranas com os anticorpos primários e secundários foi observado que apenas a membrana referente à transfecção com o pré-miR-146a foi marcada e somente para o anticorpo

anti-IRAK1. Dessa forma, a Tabela 15 mostra apenas o resultado referente a esta marcação.

Os Western Blottings para as marcações com os anticorpos anti-IFNG e anti-TRAF6 foram realizados na sequência. Entretanto, não foi possível observar as marcações dos anticorpos. Dessa forma, os resultados não são apresentados.

A quantificação da expressão da proteína IRAK1 foi realizada por densitometria das bandas obtidas e foi verificado que com o aumento da quantidade de miR-146a transfectado houve uma diminuição da expressão da proteína, corroborando com os resultados da qPCR.

Tabela 15. Quantificação da expressão da proteína IRAK1 após transfecção das células MT-2 com pré-miR-146a. Imagem das bandas obtidas do Western Blotting. Razão dos dados de volume das bandas da proteína endógena (β -actina) pelas bandas da proteína de interesse (IRAK1).

[pré-miR-146a] Anticorpo	30 nM	50 nM	70 nM	100 nM
Anti- β -actina
Anti-IRAK1
Razão ($V_{\text{IRAK1}}/V_{\beta\text{-actina}}$)	0,4838	0,4583	0,4301	0,1087

Discussão

V. DISCUSSÃO

O papel dos miRNAs nas infecções virais tem sido amplamente estudado pois estes pequenos RNAs podem direcionar a infecção viral no sentido de eliminar e/ou diminuir a replicação viral ou ainda promover o desencadeamento de alguma doença associada ao vírus. Neste trabalho, foi realizada a avaliação funcional de miRNAs a fim de tentar elucidar o papel dessas moléculas na infecção pelo HTLV-1, bem como buscar os mecanismos de desenvolvimento das doenças associadas, como a HAM/TSP. Desta forma, após a avaliação do perfil de expressão de miRNAs de linfócitos T CD4⁺, foram selecionados os miRNAs miR-125b-1-1 e miR-146a que se mostravam desregulados nos linfócitos T CD4⁺ de indivíduos infectados, e após a análise *in silico* para predição de alvos, foram eleitos os genes alvos: IFNG, IRAK1 e TRAF6 para validação funcional.

Neste trabalho, foram utilizados linfócitos T CD4⁺ para a análise dos miRNAs e seus genes alvo. Os linfócitos T CD4⁺ são preferencialmente infectados pelo HTLV-1, embora outras células possam ser infectadas, como células dendríticas, linfócitos B e macrófagos (Koyanagi et al., 1993). A resposta dos linfócitos T CD4⁺ é de importância central no direcionamento das atividades dos linfócitos T CD8⁺ e B. Além disso, pacientes HAM/TSP possuem maior taxa de linfócitos T CD4⁺ específicos para o HTLV-1 (Goon et al., 2004; Nose et al., 2007), com predominância do fenótipo T-*helper* 1 (Th1) (Goon et al., 2002) e maior produção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 por essas células (Goon et al., 2002; Goon et al., 2003), em comparação com indivíduos assintomáticos.

Dessa forma, as células foram coletadas de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e divididos em dois grupos de acordo com o estado clínico em HAC e HAM/TSP. A caracterização dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 incluídos neste estudo evidenciou que havia uma predominância (76,2%) de indivíduos do sexo feminino no grupo HAM/TSP. Esses dados corroboram com a literatura que relatam que o sexo feminino apresenta maior prevalência de infecção pelo HTLV-1 (Manns and Blattner, 1991), cuja razão de infecção homens/mulheres é de 0,4 (Kramer et al., 1995). Vários estudos postularam que a eficiência da transmissão viral é maior na direção homem-mulher e não o contrário (Kajiyama et al., 1986; Murphy et al., 1989a).

Outro fator bem estabelecido que contribui para o desenvolvimento de HAM/TSP em indivíduos infectados é a CPV, que já foi reportada ser 100 vezes

maior em pacientes HAM/TSP quando comparados com indivíduos assintomáticos (Jeffery et al., 1999; Manns et al., 1999; Nagai et al., 1998; Yamano et al., 2002). Em concordância com a literatura, os resultados de CPV obtidos neste trabalho, demonstraram que os pacientes HAM/TSP apresentam CPV 5,3 vezes maior do que os indivíduos assintomáticos estudados. 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 (Matsuzaki et al., 2001; Nagai et al., 1998).

Um outro fator que pode contribuir no estabelecimento viral assim como de doenças causadas por infecções virais são os miRNAs. As diversas vias celulares controladas pelos miRNAs somada a alteração do perfil de expressão dos miRNAs do hospedeiro representam mecanismos pelo qual o hospedeiro pode se defender do vírus ou mesmo pelo qual os vírus podem se replicar e aumentar o controle celular. Neste trabalho, os resultados obtidos demonstraram que a infecção pelo HTLV-1 altera a expressão dos miRNAs celulares let-7a, miR-223, miR-125b-1-1, miR-34a, miR-26a e miR-146a. A partir desses resultados, foram selecionados para prosseguir a análise funcional: os miR-125b-1-1e miR-146a. Os critérios para seleção destes foram a expressão alterada em linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1, a importância da função biológica dos miRNAs e a significância dos genes alvos, obtidos após predição por meio de análises *in silico*.

Diversos estudos descrevem o envolvimento dos miRNAs no desenvolvimento da resposta imunológica antiviral. Jangra e cols (2010) demonstrou o papel do hsa-miR-122 no processo de replicação do vírus da hepatite C (HCV). Este miRNA quando inibido reduz significativamente a quantidade de partículas virais produzidas pelos hepatócitos. Outro exemplo é o HIV-1, cuja infecção por si só, faz com que células humanas infectadas apresentem mudanças na expressão dos miRNAs (Houzet et al., 2008). Estes autores demonstraram que ocorre alteração no perfil de expressão de diversos miRNAs e que esta é dependente da carga viral e da contagem de linfócitos T CD4⁺ dos indivíduos, o que sugere a utilização de miRNAs como marcadores prognósticos. Buggele e cols. (2012) demonstraram em um estudo com linhagens celulares de pulmão que ocorre aumento dos miRNAs miR-7, miR-132, miR-146a, miR-187, miR-200c e miR-1275 em resposta à infecção pelo vírus influenza A, diminuindo a expressão de proteínas antivirais MAPK3 e IRAK1.

Essas evidências demonstram que hospedeiros codificam miRNAs que podem permitir uma rápida e efetiva forma de regulação de genes específicos, contribuindo para o controle da infecção viral ou mesmo permitir o estabelecimento viral. Dessa forma, cria-se a necessidade de elucidar essa complexa rede de interação entre os miRNAs e a patogênese da infecção viral.

Os primeiros trabalhos que relacionaram a modulação da expressão de miRNAs humanos e a infecção pelo HTLV-1 foram os de Pichler e cols. (2008) e Yeung e cols. (2008). Pichler e cols. (2008) demonstraram que os miR-221, miR-24, miR-146a e miR-155 estavam com sua expressão aumentada em uma série de linhagens celulares derivadas de pacientes com ATL, HAM/TSP e células transformadas por HTLV-1 ou Tax, enquanto que o miR-223 estava com sua expressão reprimida quando comparados com controles negativos. Os ensaios funcionais demonstraram que a expressão do miR-146a estava diretamente relacionada à ativação pelo fator de transativação Tax (Pichler et al., 2008). Já no trabalho de Yeung e cols. (2008) foram observados que três miRNAs: miR-93, miR-130b e miR-18a, apresentaram uma expressão aumentada em linhagem celular de ATL e amostras de PBMC de pacientes com ATL agudo, quando comparadas com controles. Ainda neste estudo, foi demonstrado que a proteína supressora de tumor induzido por p53 (TP53INP1) era alvo de miR-93 e miR-130b (Yeung et al., 2008). Esses dois estudos demonstram que a infecção do HTLV-1 modula a expressão de miRNAs humanos.

Com base nestas evidências, sugere-se que o desarranjo dos miRNAs do hospedeiro causado pelo HTLV-1 pode influenciar no estabelecimento da infecção e/ou desenvolvimento das doenças associadas a esta infecção. Poucos estudos correlacionam a expressão dos miRNAs celulares com o desenvolvimento de HAM/TSP. Dessa forma, o foco nos miRNAs pode auxiliar na elucidação dos papéis destes pequenos RNAs nesta mielopatia. Entretanto, para melhor elucidação dos mecanismos moleculares desta infecção é necessário que os estudos apontem os alvos desses miRNAs. Desta forma, neste trabalho foram investigados potenciais alvos dos miRNAs escolhidos para os estudos funcionais, os miR-125b-1-1 e miR-146a.

Na análise *in silico*, considera-se a possibilidade de muitos alvos de cada miRNA, uma vez que um único miRNA pode ter como alvo vários RNAm. Dessa forma, a predição de gene alvo se torna laboriosa e complexa, exigindo ferramentas

de predição de alvo *in silico*. Assim, os algoritmos computacionais têm sido essenciais para identificar alvos candidatos. Cada um desses algoritmos emprega uma variedade de princípios e características para a predição e reconhecimento do alvo do miRNA, como por exemplos a utilização de padrões de pareamento de base, a análise termodinâmica do duplex miRNA-gene alvo, a conservação do sítio alvo entre espécies e a acessibilidade do sítio alvo. Durante este trabalho, foi utilizado o banco de dados *online* miRGen, que integra os algoritmos PicTar, miRanda, TargetScan, DIANA-microT. Cada um deles apresenta características de predição distintas resumidas a seguir:

- PicTar (Lall et al., 2006): este algoritmo possui requerimentos rigorosos em relação à região semente e ainda considera a estabilidade global baseado na energia livre mínima. Uma vez que os sítios estão alinhados, os genes alvo são classificados baseados em um *score* que considera a conservação do sítio de ligação do miRNA.

- miRanda (Betel et al., 2008; John et al., 2004): usa um rigoroso algoritmo de programação dinâmica para obter as sequências candidatas. Este algoritmo usa um *score* para classificar as predições que consistem *matches*, *mismatches* e oscilações G:U. O algoritmo miRanda (John et al., 2004) considerava características como complementaridade da região semente e energia livre do duplex.

- TargetScan: este algoritmo requer uma complementaridade da região da semente de pelo menos seis nucleotídeos e considera tipos diferentes de sementes com uma certa hierarquia (6 mer *offset* < 6mer < 7mer-A1 < 7mer-m8 < 8mer) (Bartel, 2009). Além disso, TargetScan classifica os sítios usando um *score* baseado na complementaridade da região semente, conservação e proximidade do sítio de AU.

- DIANA (Maragkakis et al., 2009): este algoritmo mede a qualidade da interação baseada em suas características específicas. Cada gene é avaliado considerando sítios conservados e não conservados. Ademais, uma taxa de ruído sinal é obtido para cada interação para estimar o número de falsos positivos.

Por usar vários algoritmos, a análise *in silico* foi realizada cuidadosamente a fim de selecionar os genes potencialmente alvos. Assim, foram selecionados os genes *IFNG* como potencial gene alvo do miR-125b-1-1 e os genes *IRAK1* e *TRAF6* para o miR-146a. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o gene *IFNG* está mais expresso nos indivíduos infectados, principalmente no grupo de

sintomáticos, quando comparados com o grupo CT. A expressão deste gene corroborou com o resultado obtido para a quantificação do miR-125b-1-1, uma vez que a expressão do IFN- γ está aumentada em pacientes HAM/TSP e a do miRNA está diminuída. Dessa forma, pode-se sugerir que o miR-125b-1-1 esteja participando no desenvolvimento de HAM/TSP.

O IFN- γ é uma citocina pertencente à família de interferons do tipo II e é primariamente secretada por células *natural killers* (NK), linfócitos T CD4⁺ *helper* tipo I (Th1) e linfócitos T citotóxicos (CTLs). O IFN- γ possui uma variedade de efeitos imunomodulatórios tanto na imunidade inata quanto na adquirida (Farrar and Schreiber, 1993).

A quantificação do *IFNG* demonstrou que houve aumento da expressão nos indivíduos infectados pelos HTLV-1, em especial nos pacientes HAM/TSP, quando comparados com o grupo controle, corroborando com dois estudos anteriores. No estudo de Montanheiro e cols. (2009) realizado com PBMCs de indivíduos HTLV-1⁺ foi demonstrado que houve aumento na expressão deste gene. Já Hanon e cols. (2001) demonstraram que em PBMCs que expressavam Tax havia um aumento da citocina IFN- γ , tanto em indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1 quanto pacientes HAM/TSP. Uma possível explicação para este aumento seria a influência positiva, direta ou indireta, de Tax na produção de IFN- γ e proliferação de linfócitos T (Hanon et al., 2001). Algumas hipóteses sugerem que altas taxas de produção de IFN- γ por linfócitos infectados T infectados contribuem na inflamação crônica observada no sistema nervoso central de pacientes com HAM/TSP (Brown et al., 1991; Umehara et al., 1994).

A citocina IFN- γ participa do processo inflamatório de muitas doenças autoimunes. Observações em modelos de encefalomielite autoimune (EA) sugerem que a desmielinização do sistema nervoso central (SNC) autoimune seria uma doença direcionada por resposta Th1 e IFN- γ . A patologia da EA é caracterizada por infiltração do cérebro e cordão espinhal por células linfocíticas e mononucleares. Foi demonstrado que o infiltrado de linfócitos T tipicamente expressa IFN- γ corroborando com a idéia de a doença ser direcionada por resposta Th1. Vários autores demonstraram que a expressão de IFN- γ está correlacionado com desmielinização do SNC (Horwitz et al., 1997; Renno et al., 1998). No modelo de HTLV-1, foi demonstrado que ocorre um aumento de IFN- γ no fluido cérebro

espinal (CSF) de pacientes com HAM/TSP (Kuroda and Matsui, 1993), levantando a questão de que o IFN- γ possa estar propiciando o desenvolvimento da doença.

Além disso, foi demonstrado neste trabalho que a expressão do gene *IFNG* nos linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1 está significativamente correlacionada com a CPV. Outros trabalhos demonstraram altas concentrações de IFN- γ no plasma e no fluido cerebrospinal de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (Goon et al., 2004; Nishiura et al., 1996; Umehara et al., 1993) e uma direta correlação dos níveis de IFN- γ com a CPV (Asquith and Bangham, 2000).

Com relação aos genes alvo do miR-146a, o gene *TRAF6* está aumentado em indivíduos infectados pelo HTLV-1 comparados com o grupo CT enquanto que não há diferença significativa entre os grupos estudados para o gene *IRAK1*. Ao contrário do esperado, o miR-146a também está mais expresso no indivíduos infectados pelo HTLV-1. Como predito pelos algoritmos utilizados na análise *in silico* de predição de alvo, acreditou-se que haveria uma relação inversa na expressão dos genes alvo, *TRAF6* e *IRAK1*, e miR-146a. No entanto, não houve correlação negativa entre o miRNA e os genes alvo.

Os genes alvo *IRAK1* e *TRAF6* participam da cascata de ativação de NF- κ B, que é uma importante via de ativação durante a infecção pelo HTLV-1. A via de NF- κ B é ativada por vários vírus, incluindo vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus influenza e o HTLV-1. Sugere-se que esta ativação possua várias funções que auxiliam a instalação viral, como promoção da replicação viral e prevenção da apoptose induzida pelo vírus. Além disso, esta via participa da resposta imune contra o patógeno (revisado por (Hiscott et al., 2001).

O fator de transcrição NF- κ B é mantido inativo na maioria das células pela interação com proteínas inibitórias da família I κ Bs. A ativação de NF- κ B em resposta a distintos agentes, faz com que as I κ Bs sejam rapidamente fosforiladas pelo complexo de proteína quinase I κ B (IKK). Após uma série de fosforilações, a I κ B é degradada e libera NF- κ B.

A via de NF- κ B pode ser ativada em resposta a ligação de um antígeno ao receptor Toll-*like* (TLR). Desse modo, esse receptor se dimeriza e recruta a molécula adaptadora, MyD88, que por sua vez recruta as quinases IRAK4 e IRAK1. IRAK4 fosforila IRAK1 após dissociação de MyD88 e induz a ativação de TRAF6. Em seguida, TRAF6 ativa um complexo quinases e proteínas ligadas. Esse complexo

fosforila IKK que permite a liberação de NF- κ B, resultando na indução de genes envolvidos nas respostas inflamatórias, como TNF α , IL-6, IL-1 β e IL-12, além do aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias nas células apresentadoras de antígenos (APCs). A ativação desta via por TLRs é capaz ainda de induzir a produção de interferons do tipo I, como IFN- α e IFN- β , importantes citocinas de ação antiviral.

O fator de transcrição NF- κ B também pode ser modulado pela expressão da proteína do HTLV-1 Tax. A proteína Tax pode ligar-se nas proteínas inibitórias I κ Bs e fazer com que haja degradação das mesmas. Como consequência, ocorre liberação e ativação do NF κ B.

A fim de comprovar que os genes *TRAF6/IRAK1* e *IFNG* são genes alvo do miR-146a e miR-125b-1-1, respectivamente, foram realizados ensaios de validação utilizando plasmídeos contendo o gene luciferase, no qual pode-se avaliar a inibição de um dado gene clonado no mesmo vetor. A partir da análise *in silico* realizada para predição de alvo dos miR-125b-1-1e miR-146a, foram localizadas as regiões dos genes alvo *IFNG*, *IRAK1* e *TRAF6* e sintetizados oligonucleotídeos referentes aos sítios de ligação dos miRNAs na região 3' UTR desses genes. Os oligonucleotídeos passaram por um passo de anelamento para compor uma dupla fita que foi clonada no vetor *reporter* do *pMIR-REPORT*.

Os clones obtidos foram transfectados em células HEK-293T e tiveram a atividade de luciferase avaliada. Em seguida, as células com os clones positivos para atividade enzimática tiveram os vetores sequenciados. A análise dos eletroferogramas obtidos após o sequenciamento destes vetores demonstrou que as sequências não haviam sido clonadas corretamente, uma vez que não foi possível visualizar os oligonucleotídeos previamente clonados. Sugere-se que pode ter ocorrido algum *mismatch* no passo de anelamento dos oligonucleotídeos, uma vez que eles podem formar dímeros diferentes dos esperados se houver alguma interação entre os mesmos.

Uma abordagem que poderia ter sido utilizada seria a aquisição de oligonucleotídeos, referentes à região de ligação do miRNA, sintetizados como fita dupla, ao contrário do utilizado, fita simples. Dessa forma, se contorna o problema causado no passo de anelamento.

Apesar deste impasse, os ensaios com os miRNAs miméticos foram realizados com base na literatura que embasa a validade dos genes alvo. Hou e cols (Hou et

al., 2009) demonstraram que os genes *IRAK1* e *TRAF6* são genes alvo do miR-146a e Rossi e cols (Rossi et al., 2011) demonstraram que o *IFNG* é regulado diretamente pelo miR-125b-1-1 por meio de ensaios de luciferase.

Dessa forma, células da linhagem MT-2 foram utilizadas para o ensaio de superexpressão de miR-125b-1-1 e miR-146a. Após a transfecção, os genes dos miRNAs e dos genes alvo foram avaliados por meio de qPCR e *Western Blotting*.

Os resultados da qPCR demonstraram que ocorre uma desregulação do do gene *IFNG* após a superexpressão do miR-125b-1-1 e dos genes alvo *IRAK1* e *TRAF6* após a superexpressão do miR-146a. A expressão do miR-125b-1-1 e do seu alvo *IFNG* correlacionaram-se negativamente, de forma que demonstra que ocorre regulação do gene *IFNG* por este miRNA. Este resultado corrobora com os dados de expressão obtidos nos linfócitos T CD4⁺ em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Ambos resultados demonstraram que o aumento dos níveis de miR-125b está correlacionado com a diminuição da expressão do gene *IFNG*. Dessa forma, sugere-se que o miR-125b esteja modulando a expressão de *IFNG* em células infectadas pelo HTLV-1, sendo necessária a confirmação do alvo por meio dos ensaios utilizando o vetor *pMIR-REPORT*.

Poucos estudos correlacionam o papel de miR-125b-1-1 em infecções virais. Nuovo e cols. (2010) demonstraram que o miR-125b-1-1 reduz a replicação do DNA do papilomavirus (HPV) em modelos *in vitro*. O miR-125b pertence a uma rede de interação de miRNAs anti-HIV que suprimem a replicação viral (29-30). Esses miRNAs se ligam em regiões 3'UTR de transcritos virais inibindo a replicação do HIV-1. Sugere-se que esses miRNAs anti-HIV, juntamente com o miR-125b, sejam responsáveis pela indução da latência viral em linfócitos T CD4⁺ *naïves* (29). Ainda tem sido sugerido que a expressão diminuída do miR-125b em PBMCs de indivíduos infectados pelo HIV-1 pode levar ao aumento da viremia viral nestes indivíduos (31).

Em contraste com os achados deste trabalho, Nicolette e cols. (2012) demonstraram que ocorre um aumento da expressão do miR-125b-1-1 após a infecção pelo HTLV-1. Entretanto, este achado foi realizado em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de indivíduos infectados, o que pode explicar tal discordância. Os PBMCs possuem vários tipos celulares, incluindo monócitos e linfócitos e seus fenótipos. Os monócitos não são infectadas pelo HTLV-1, o que poderia, parcialmente, mascarar a taxa de expressão deste miRNA. Mesmo entre os linfócitos T, a infecção não é homogênea, como relatado

anteriormente. Dessa forma, a abordagem relatada em nosso trabalho torna-se mais verossímil.

Apesar de pouco estudado, observa-se que o miR-125b pode estar envolvido em mecanismos de controle de infecções virais. Apenas um trabalho correlaciona o miR-125b com o gene *IFNG* em linfócitos T CD4⁺ *naïves*. Como relatado na literatura, o IFN- γ possui um papel importante no desenvolvimento de HAM/TSP, e dessa forma, torna-se importante a elucidação da interação entre esse miRNA e o *IFNG*, especialmente neste trabalho, no qual foi relatado um aumento do miR-125b em indivíduos assintomáticos e aumento de *IFNG* em pacientes HAM/TSP. Dessa forma, acredita-se que a regulação do *IFNG* pelo miR-125b possa auxiliar no controle do desenvolvimento dessa doença.

A expressão do gene *TRAF6* não foi correlacionado com o miR-146a exatamente como o esperado. Houve, de alguma forma, uma alteração da expressão desse gene, entretanto é necessário estudos extras para poder afirmar ou sugerir alguma informação a partir deste resultado. Por outro lado, o crescente aumento da concentração do pré-miR-146a desencadeou uma diminuição do gene *IRAK1*, demonstrando que o miR-146a regula a expressão deste gene.

O resultado do Western Blotting confirmou os dados obtidos na qPCR para a interação do miR-146a e o gene *IRAK1*. A densitometria mostrou uma diminuição da proteína IRAK1 em resposta ao aumento da concentração de pré-miR-146a transfectado nas células MT-2.

Outros estudos demonstraram que o miR-146a inibe a expressão de *IRAK1* e *TRAF6* (Bhaumik et al., 2008; Taganov et al., 2006), principais moléculas adaptadoras *downstream* das vias de sinalização de Toll-*like* e receptores IL-1 (TIRs) (Jensen et al., 2000; Ye et al., 2002), diminui a atividade de NF- κ B (Bhaumik et al., 2008) e suprime a expressão de genes alvo de NF- κ B, como IL-6, IL-8, IL-1 β e TNF- α (Bhaumik et al., 2008; Pauley et al., 2008). Em linfócitos, miR-146a ainda pode inibir a expressão de INF- γ e óxido nítrico sintase induzida por LPS (Dai et al., 2008).

O miR-146a possui ainda um papel importante em infecções virais. A infecção pelo vírus da estomatite vesicular (VSV) aumenta a expressão de miR-146a, que por sua vez promove a replicação viral e age como um regulador negativo da resposta antiviral por diminuir a expressão de *TRAF6*, *IRAK1* e *IRAK2* (Hou et al., 2009). Ainda, estudos em células infectadas pelo vírus Epstein-Barr (EBV) demonstraram

que a proteína de membrana latente 1 induzida por EBV induz a expressão de miR-146a (Cameron et al., 2008; Motsch et al., 2007), demonstraram que na infecção pelo HTLV-1, o miR-146a tem sua expressão alterada em linhagens celulares infectadas por este vírus e em células ATLL (Bellon et al., 2009).

Tomita e cols. (2012) demonstraram que os genes *TRAF6* e *IRAK1* são alvos do miR-146a, e que este é altamente expresso em linhagens celulares e é diretamente induzido por Tax pela ativação da via de sinalização de NF- κ B (Tomita et al., 2012). A indução da expressão do miR-146a por Tax explica parcialmente a elevada expressão do miRNA em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Além disso, como os genes *TRAF6* e *IRAK1* são comprovadamente alvos do miR-146a algum outro mecanismo deve estar atuando para o elevado nível de *TRAF6*.

Takahashi e cols. (2010) demonstraram em modelo de doença arterio-coronariana (DAC) a mesma discrepância de expressão *in vivo* e *in vitro* observados nos nossos resultados. Eles observaram que os níveis de miR-146a e *IRAK1*/*TRAF6* eram correlacionados positivamente *in vivo* enquanto que *in vitro*, em ensaios de ganho e perda de função do miR-146a essa correlação era negativa. Eles sugeriram então que essa discrepância poderia contribuir para uma prolongada ativação de TLR e sua cascata de sinalização em pacientes com DAC.

Da mesma forma que Takahashi e cols (Takahashi et al., 2010) nós observamos resultado discrepantes nos ensaios *in vivo* e *in vitro*. Não foi observada diferença dos níveis de *IRAK1* entre os indivíduos infectados pelo HTLV-1 apesar de ocorrer aumento do miR-146a, entretanto foi demonstrado que ocorre regulação do gene alvo pelo miRNA no ensaio de superexpressão do miR-146a. Similarmente, não foi observada correlação negativa entre o miR-146a e o gene *TRAF6* em indivíduos infectados pelo HTLV-1. Como relatado anteriormente, *IRAK1* e *TRAF6* participam da cascata de ativação de NF- κ B, uma importante via relacionada com a infecção pelo HTLV-1. A via do NF- κ B é ativada pela proteína viral Tax e dessa forma, esse mecanismo pode estar contribuindo para a alteração tanto do miR-146a quanto de seus genes alvo *IRAK1* e *TRAF6*. Dessa forma, a discrepância nesses resultados pode estar relacionada com a patogênese desta infecção viral, devido a excessiva ativação da via de NF- κ B. No entanto, são necessário maiores esforços para elucidar o papel da interação do miRNA com os seus genes alvo no contexto desta cascata de ativação.

A partir dos resultados apresentados foi demonstrado que ocorre uma desregulação dos miRNAs celulares durante a infecção pelo HTLV-1 em linfócitos T CD4⁺. Sugere-se que a expressão de miR-125b-1-1 esteja relacionada com o desenvolvimento de HAM/TSP, uma vez que observou-se que a expressão do seu gene alvo, *IFNG*, está aumentado nesses pacientes. Acredita-se que a expressão de miR-146a esteja envolvida com os mecanismos de estabelecimento da infecção pelo HTLV-1. Assim, este trabalho abre um vasto leque de oportunidades acerca dos mecanismos utilizados pelos miRNAs na modulação da infecção pelo HTLV-1 e estabelecimento de HAM/TSP. Entretanto são necessários maiores esforços para sugerir a relação entre os miR-125b-1-1 e miR-146a, a seus genes potencialmente alvos e a infecção pelo HTLV-1. Dessa forma, o entendimento dos mecanismos moleculares utilizados pelo HTLV-1 pode ser utilizado na elucidação da infecção e desenvolvimento das doenças associadas, bem como para uma possível intervenção terapêutica efetiva, na interrupção da atividade ou eliminação do agente viral.

Conclusão

VI. CONCLUSÃO

Conclui-se após a realização deste trabalho que a infecção pelo HTLV-1 modula a expressão de vários miRNAs em linfócitos T CD4⁺ de indivíduos infectados. Além disso, o miR-125b-1-1 modula a expressão do gene *IFNG* e o miR-146a modula a expressão do gene *IRAK1* e sua proteína. Estudos adicionais necessitam ser realizados a fim de poder concluir sobre a interação destes miRNAs e seus genes alvo nos mecanismos envolvidos na infecção pelo HTLV-1

Referências Bibliográficas

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albrecht, B., Collins, N.D., Newbound, G.C., Ratner, L., and Lairmore, M.D. (1998). Quantification of human T-cell lymphotropic virus type 1 proviral load by quantitative competitive polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 75, 123-140.
- Asquith, B., and Bangham, C.R. (2000). The role of cytotoxic T lymphocytes in human T-cell lymphotropic virus type 1 infection. *J Theor Biol* 207, 65-79.
- Bangham, C.R., and Osame, M. (2005). Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene* 24, 6035-6046.
- Barnard, A.L., Igakura, T., Tanaka, Y., Taylor, G.P., and Bangham, C.R. (2005). Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood* 106, 988-995.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215-233.
- Basyuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonne, R., and Bertrand, E. (2003). Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res* 31, 6593-6597.
- Bellon, M., Lepelletier, Y., Hermine, O., and Nicot, C. (2009). Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood* 113, 4914-4917.
- Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D.S., and Sander, C. (2008). The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* 36, D149-153.
- Bhaumik, D., Scott, G.K., Schokrpur, S., Patil, C.K., Campisi, J., and Benz, C.C. (2008). Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene* 27, 5643-5647.
- Biddison, W.E., Kubota, R., Kawanishi, T., Taub, D.D., Cruikshank, W.W., Center, D.M., Connor, E.W., Utz, U., and Jacobson, S. (1997). Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ CTL clones from patients with HTLV-I-associated neurologic disease secrete proinflammatory cytokines, chemokines, and matrix metalloproteinase. *J Immunol* 159, 2018-2025.
- Bilen, J., Liu, N., and Bonini, N.M. (2006). A new role for microRNA pathways: modulation of degeneration induced by pathogenic human disease proteins. *Cell Cycle* 5, 2835-2838.
- Biswas, H.H., Engstrom, J.W., Kaidarova, Z., Garratty, G., Gible, J.W., Newman, B.H., Smith, J.W., Ziman, A., Friley, J.L., Sacher, R.A., *et al.* (2009). Neurologic abnormalities in HTLV-I- and HTLV-II-infected individuals without overt myelopathy. *Neurology* 73, 781-789.
- Blattner, W.A., Kalyanaraman, V.S., Robert-Guroff, M., Lister, T.A., Galton, D.A., Sarin, P.S., Crawford, M.H., Catovsky, D., Greaves, M., and Gallo, R.C. (1982). The human type-C retrovirus, HTLV, in Blacks from the Caribbean region, and relationship to adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int J Cancer* 30, 257-264.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185-191.

- Bouzar, A.B., and Willems, L. (2008). How HTLV-1 may subvert miRNAs for persistence and transformation. *Retrovirology* 5, 101.
- Brown, D.A., Nelson, F.B., Reinherz, E.L., and Diamond, D.J. (1991). The human interferon-gamma gene contains an inducible promoter that can be transactivated by tax I and II. *Eur J Immunol* 21, 1879-1885.
- Buggele, W.A., Johnson, K.E., and Horvath, C.M. (2012). Influenza A virus infection of human respiratory cells induces primary microRNA expression. *J Biol Chem* 287, 31027-31040.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957-1966.
- Calattini, S., Betsem, E., Bassot, S., Chevalier, S.A., Mahieux, R., Froment, A., and Gessain, A. (2009). New strain of human T lymphotropic virus (HTLV) type 3 in a Pygmy from Cameroon with peculiar HTLV serologic results. *J Infect Dis* 199, 561-564.
- Calattini, S., Chevalier, S.A., Duprez, R., Bassot, S., Froment, A., Mahieux, R., and Gessain, A. (2005). Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology* 2, 30.
- Cameron, J.E., Yin, Q., Fewell, C., Lacey, M., McBride, J., Wang, X., Lin, Z., Schaefer, B.C., and Flemington, E.K. (2008). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways. *J Virol* 82, 1946-1958.
- Carneiro-Proietti, A.B., Ribas, J.G., Catalan-Soares, B.C., Martins, M.L., Brito-Melo, G.E., Martins-Filho, O.A., Pinheiro, S.R., Araujo Ade, Q., Galvao-Castro, B., de Oliveira, M.S., *et al.* (2002). [Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 35, 499-508.
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., *et al.* (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309, 1559-1563.
- Carrington, J.C., and Ambros, V. (2003). Role of microRNAs in plant and animal development. *Science* 301, 336-338.
- Catalan-Soares, B.C., Carneiro-Proietti, A.B., Da Fonseca, F.G., Correa-Oliveira, R., Peralva-Lima, D., Portela, R., Ribas, J.G., Goncalves, D.U., and Proietti, F.A. (2009). HLA class I alleles in HTLV-1-associated myelopathy and asymptomatic carriers from the Brazilian cohort GIPH. *Med Microbiol Immunol* 198, 1-3.
- Cavrois, M., Wain-Hobson, S., Gessain, A., Plumelle, Y., and Wattel, E. (1996). Adult T-cell leukemia/lymphoma on a background of clonally expanding human T-cell leukemia virus type-1-positive cells. *Blood* 88, 4646-4650.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744.
- Cheng, A.M., Byrom, M.W., Shelton, J., and Ford, L.P. (2005a). Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 33, 1290-1297.

- Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., Long, J., Stern, D., Tammana, H., Helt, G., *et al.* (2005b). Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* 308, 1149-1154.
- Dai, R., Phillips, R.A., Zhang, Y., Khan, D., Crasta, O., and Ahmed, S.A. (2008). Suppression of LPS-induced Interferon-gamma and nitric oxide in splenic lymphocytes by select estrogen-regulated microRNAs: a novel mechanism of immune modulation. *Blood* 112, 4591-4597.
- de The, G., and Bomford, R. (1993). An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? *AIDS Res Hum Retroviruses* 9, 381-386.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231-235.
- Dooneief, G., Marlink, R., Bell, K., Marder, K., Renjifo, B., Stern, Y., and Mayeux, R. (1996). Neurologic consequences of HTLV-II infection in injection-drug users. *Neurology* 46, 1556-1560.
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., and Sharp, P.A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 457-467.
- Etoh, K., Tamiya, S., Yamaguchi, K., Okayama, A., Tsubouchi, H., Ideta, T., Mueller, N., Takatsuki, K., and Matsuoka, M. (1997). Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells in vivo. *Cancer Res* 57, 4862-4867.
- Farrar, M.A., and Schreiber, R.D. (1993). The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol* 11, 571-611.
- Ferreira Junior, O.C., Vaz, R.S., Carvalho, M.B., Guerra, C., Fabron, A.L., Rosembliit, J., and Hamerschlag, N. (1995). Human T-lymphotropic virus type I and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from Sao Paulo, Brazil. *Transfusion* 35, 258-263.
- Feuer, G., and Green, P.L. (2005). Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* 24, 5996-6004.
- Galvao-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., *et al.* (1997). Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion* 37, 242-243.
- Gessain, A., Barin, F., Vernant, J.C., Gout, O., Maurs, L., Calender, A., and de The, G. (1985). Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2, 407-410.
- Gessain, A., and Cassar, O. (2012). Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol* 3, 388.
- Gessain, A., Gallo, R.C., and Franchini, G. (1992). Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *J Virol* 66, 2288-2295.
- Ghez, D., Lepelletier, Y., Lambert, S., Fourneau, J.M., Blot, V., Janvier, S., Arnulf, B., van Endert, P.M., Heveker, N., Pique, C., *et al.* (2006). Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol* 80, 6844-6854.

- Goon, P.K., Hanon, E., Igakura, T., Tanaka, Y., Weber, J.N., Taylor, G.P., and Bangham, C.R. (2002). 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* 99, 3335-3341.
- Goon, P.K., Igakura, T., Hanon, E., Mosley, A.J., Asquith, B., Gould, K.G., Taylor, G.P., Weber, J.N., and Bangham, C.R. (2003). High circulating frequencies of tumor necrosis factor alpha- and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD4+ T cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *J Virol* 77, 9716-9722.
- 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., *et al.* (2004). Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD4+ T cells: immunodominance hierarchy and preferential infection with HTLV-I. *J Immunol* 172, 1735-1743.
- Gotuzzo, E., Arango, C., de Queiroz-Campos, A., and Isturiz, R.E. (2000). Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. *Infect Dis Clin North Am* 14, 211-239, x-xi.
- Grassmann, R., and Jeang, K.T. (2008). The roles of microRNAs in mammalian virus infection. *Biochim Biophys Acta* 1779, 706-711.
- Grewal, S.I., and Moazed, D. (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science* 301, 798-802.
- Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32, D109-111.
- Haddad, R., Ciliao Alves, D.C., Rocha-Junior, M.C., Azevedo, R., do Socorro Pombo-de-Oliveira, M., Takayanagui, O.M., Donadi, E.A., Covas, D.T., and Kashima, S. (2011). HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism is a risk factor for HTLV-1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 27, 283-288.
- Hammond, S.M. (2006). RNAi, microRNAs, and human disease. *Cancer Chemother Pharmacol* 58 Suppl 1, s63-68.
- Hanon, E., Goon, P., Taylor, G.P., Hasegawa, H., Tanaka, Y., Weber, J.N., and Bangham, C.R. (2001). High production of interferon gamma but not interleukin-2 by human T-lymphotropic virus type I-infected peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 98, 721-726.
- Hino, S. (2011). Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 87, 152-166.
- Hiscott, J., Kwon, H., and Genin, P. (2001). Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest* 107, 143-151.
- Hjelle, B., Appenzeller, O., Mills, R., Alexander, S., Torrez-Martinez, N., Jahnke, R., and Ross, G. (1992). Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. *Lancet* 339, 645-646.
- Horwitz, M.S., Evans, C.F., McGavern, D.B., Rodriguez, M., and Oldstone, M.B. (1997). Primary demyelination in transgenic mice expressing interferon-gamma. *Nat Med* 3, 1037-1041.
- Hou, J., Wang, P., Lin, L., Liu, X., Ma, F., An, H., Wang, Z., and Cao, X. (2009). MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2. *J Immunol* 183, 2150-2158.

- Houzet, L., Yeung, M.L., de Lame, V., Desai, D., Smith, S.M., and Jeang, K.T. (2008). MicroRNA profile changes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seropositive individuals. *Retrovirology* 5, 118.
- Jain, P., Manuel, S.L., Khan, Z.K., Ahuja, J., Quann, K., and Wigdahl, B. (2009). DC-SIGN mediates cell-free infection and transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 by dendritic cells. *J Virol* 83, 10908-10921.
- Jangra, R.K., Yi, M., and Lemon, S.M. (2010). Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122. *J Virol* 84, 6615-6625.
- Jeffery, K.J., Usuku, K., Hall, S.E., Matsumoto, W., Taylor, G.P., Procter, J., Bunce, M., Ogg, G.S., Welsh, K.I., Weber, J.N., *et al.* (1999). HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I-associated myelopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3848-3853.
- Jensen, L.E., Muzio, M., Mantovani, A., and Whitehead, A.S. (2000). IL-1 signaling cascade in liver cells and the involvement of a soluble form of the IL-1 receptor accessory protein. *J Immunol* 164, 5277-5286.
- Jin, J., Sherer, N., and Mothes, W. (2010). Surface Transmission or Polarized Egress? Lessons Learned from HTLV Cell-to-Cell Transmission. *Viruses* 2, 601-605.
- John, B., Enright, A.J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D.S. (2004). Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2, e363.
- John, B., Enright, A.J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D.S. (2005). Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2, e363.
- Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y.K., Bertolette, D.C., and Ruscetti, F.W. (2008). Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat Med* 14, 429-436.
- Kajiya, W., Kashiwagi, S., Ikematsu, H., Hayashi, J., Nomura, H., and Okochi, K. (1986). Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. *J Infect Dis* 154, 851-857.
- Kalyanaraman, V.S., Sarngadharan, M.G., Robert-Guroff, M., Miyoshi, I., Golde, D., and Gallo, R.C. (1982). A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 218, 571-573.
- Kaplan, J.E., Khabbaz, R.F., Murphy, E.L., Hermansen, S., Roberts, C., Lal, R., Heneine, W., Wright, D., Matijas, L., Thomson, R., *et al.* (1996). Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. The Retrovirus Epidemiology Donor Study Group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 12, 193-201.
- Kaplan, J.E., Osame, M., Kubota, H., Igata, A., Nishitani, H., Maeda, Y., Khabbaz, R.F., and Janssen, R.S. (1990). The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3, 1096-1101.
- Karp, X., and Ambros, V. (2005). Developmental biology. Encountering microRNAs in cell fate signaling. *Science* 310, 1288-1289.

- Kasinski, A.L., and Slack, F.J. (2012). miRNA-34 prevents cancer initiation and progression in a therapeutically resistant K-ras and p53-induced mouse model of lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 72, 5576-5587.
- Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., Nishida, H., Yap, C.C., Suzuki, M., Kawai, J., *et al.* (2005). Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 309, 1564-1566.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* 15, 2654-2659.
- Kim, J., Inoue, K., Ishii, J., Vanti, W.B., Voronov, S.V., Murchison, E., Hannon, G., and Abeliovich, A. (2007). A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 317, 1220-1224.
- Kosik, K.S. (2006). The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci* 7, 911-920.
- Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J., Iwamasa, T., Goto, I., and Yamamoto, N. (1993). In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* 196, 25-33.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 39, D152-157.
- Kramer, A., Maloney, E.M., Morgan, O.S., Rodgers-Johnson, P., Manns, A., Murphy, E.L., Larsen, S., Cranston, B., Murphy, J., Benichou, J., *et al.* (1995). Risk factors and cofactors for human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica. *Am J Epidemiol* 142, 1212-1220.
- Krek, A., Grun, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., *et al.* (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 37, 495-500.
- Kuroda, Y., and Matsui, M. (1993). Cerebrospinal fluid interferon-gamma is increased in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 42, 223-226.
- Kuroda, Y., Matsui, M., Takashima, H., and Kurohara, K. (1993). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 increase in cerebrospinal fluid, but not in serum, of HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol* 45, 133-136.
- Kusuhara, K., Sonoda, S., Takahashi, K., Tokugawa, K., Fukushima, J., and Ueda, K. (1987). Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I): a fifteen-year follow-up study in Okinawa, Japan. *Int J Cancer* 40, 755-757.
- LaGrenade, L., Hanchard, B., Fletcher, V., Cranston, B., and Blattner, W. (1990). Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet* 336, 1345-1347.
- Lairmore, M.D., Haines, R., and Anupam, R. (2012). Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Curr Opin Virol* 2, 474-481.
- Lairmore, M.D., Jason, J.M., Hartley, T.M., Khabbaz, R.F., De, B., and Evatt, B.L. (1989). Absence of human T-cell lymphotropic virus type I coinfection in human immunodeficiency virus-infected hemophilic men. *Blood* 74, 2596-2599.

- Lall, S., Grun, D., Krek, A., Chen, K., Wang, Y.L., Dewey, C.N., Sood, P., Colombo, T., Bray, N., Macmenamin, P., *et al.* (2006). A genome-wide map of conserved microRNA targets in *C. elegans*. *Curr Biol* 16, 460-471.
- Leclercq, I., Cavois, M., Mortreux, F., Hermine, O., Gessain, A., Morschhauser, F., and Wattel, E. (1998). Oligoclonal proliferation of human T-cell leukaemia virus type 1 bearing T cells in adult T-cell leukaemia/lymphoma without deletion of the 3' provirus integration sites. *Br J Haematol* 101, 500-506.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lepoutre, V., Jain, P., Quann, K., Wigdahl, B., and Khan, Z.K. (2009). Role of resident CNS cell populations in HTLV-1-associated neuroinflammatory disease. *Front Biosci* 14, 1152-1168.
- Lin, S.L., Chang, S.J., and Ying, S.Y. (2006). First in vivo evidence of microRNA-induced fragile X mental retardation syndrome. *Mol Psychiatry* 11, 616-617.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95-98.
- Maeda, Y., Furukawa, M., Takehara, Y., Yoshimura, K., Miyamoto, K., Matsuura, T., Morishima, Y., Tajima, K., Okochi, K., and Hinuma, Y. (1984). Prevalence of possible adult T-cell leukemia virus-carriers among volunteer blood donors in Japan: a nation-wide study. *Int J Cancer* 33, 717-720.
- Majorovits, E., Nejmeddine, M., Tanaka, Y., Taylor, G.P., Fuller, S.D., and Bangham, C.R. (2008). Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PLoS One* 3, e2251.
- Manns, A., and Blattner, W.A. (1991). The epidemiology of the human T-cell lymphotropic virus type I and type II: etiologic role in human disease. *Transfusion* 31, 67-75.
- Manns, A., Miley, W.J., Wilks, R.J., Morgan, O.S., Hanchard, B., Wharfe, G., Cranston, B., Maloney, E., Welles, S.L., Blattner, W.A., *et al.* (1999). Quantitative proviral DNA and antibody levels in the natural history of HTLV-I infection. *J Infect Dis* 180, 1487-1493.
- Maragkakis, M., Alexiou, P., Papadopoulos, G.L., Reczko, M., Dalamagas, T., Giannopoulos, G., Goumas, G., Koukis, E., Kourtis, K., Simossis, V.A., *et al.* (2009). Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels. *BMC Bioinformatics* 10, 295.
- Marquez, R.T., and McCaffrey, A.P. (2008). Advances in microRNAs: implications for gene therapists. *Hum Gene Ther* 19, 27-38.
- Matsuzaki, T., Nakagawa, M., Nagai, M., Usuku, K., Higuchi, I., Arimura, K., Kubota, H., Izumo, S., Akiba, S., and Osame, M. (2001). 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. *J Neurovirol* 7, 228-234.
- Megraw, M., Sethupathy, P., Corda, B., and Hatzigeorgiou, A.G. (2006). miRGen: a database for the study of animal microRNA genomic organization and function. *Nucleic Acids Res* 35, D149-155.

- Miley, W.J., Suryanarayana, K., Manns, A., Kubota, R., Jacobson, S., Lifson, J.D., and Waters, D. (2000). Real-time polymerase chain reaction assay for cell-associated HTLV type I DNA viral load. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16, 665-675.
- Miyamoto, K., Tomita, N., Ishii, A., Nishizaki, T., Kitajima, K., Tanaka, T., Nakamura, T., Watanabe, S., and Oda, T. (1984). Transformation of ATLA-negative leukocytes by blood components from anti-ATLA-positive donors in vitro. *Int J Cancer* 33, 721-725.
- Mochizuki, M., Ono, A., Ikeda, E., Hikita, N., Watanabe, T., Yamaguchi, K., Sagawa, K., and Ito, K. (1996). HTLV-I uveitis. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13 Suppl 1, S50-56.
- Montanheiro PA, P.d.O.A., Smid J, Fukumori LM, Olah I, da S Duarte AJ, Casseb J. (2009). The elevated interferon gamma production is an important immunological marker in HAM/TSP pathogenesis. *Scand J Immunol* 70, 7.
- Motsch, N., Pfuhl, T., Mrazek, J., Barth, S., and Grasser, F.A. (2007). Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol* 4, 131-137.
- Murphy, E.L., Figueroa, J.P., Gibbs, W.N., Brathwaite, A., Holding-Cobham, M., Waters, D., Cranston, B., Hanchard, B., and Blattner, W.A. (1989a). Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Intern Med* 111, 555-560.
- Murphy, E.L., Hanchard, B., Figueroa, J.P., Gibbs, W.N., Lofters, W.S., Campbell, M., Goedert, J.J., and Blattner, W.A. (1989b). Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer* 43, 250-253.
- Murphy, E.L., Watanabe, K., Nass, C.C., Ownby, H., Williams, A., and Nemo, G. (1999). Evidence among blood donors for a 30-year-old epidemic of human T lymphotropic virus type II infection in the United States. *J Infect Dis* 180, 1777-1783.
- Nagai, M., Usuku, K., Matsumoto, W., Kodama, D., Takenouchi, N., Moritoyo, T., Hashiguchi, S., Ichinose, M., Bangham, C.R., Izumo, S., *et al.* (1998). 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* 4, 586-593.
- Nicolete, L.D., Nicolete, R., Haddad, R., Azevedo, R., Castro, F.A., Tanaka, Y., Takayanagui, O.M., Covas, D.T., and Kashima, S. (2012). Upregulation of hsa-miR-125b in HTLV-1 asymptomatic carriers and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107, 824-827.
- Nishioka, K., Maruyama, I., Sato, K., Kitajima, I., Nakajima, Y., and Osame, M. (1989). Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. *Lancet* 1, 441.
- Nishiura, Y., Nakamura, T., Ichinose, K., Shirabe, S., Tsujino, A., Goto, H., Furuya, T., and Nagataki, S. (1996). Increased production of inflammatory cytokines in cultured CD4+ cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Tohoku J Exp Med* 179, 227-233.
- Nose, H., Kubota, R., Seth, N.P., Goon, P.K., Tanaka, Y., Izumo, S., Usuku, K., Ohara, Y., Wucherpfennig, K.W., Bangham, C.R., *et al.* (2007). 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* 196, 1761-1772.

- Nuovo, G.J., Wu, X., Volinia, S., Yan, F., di Leva, G., Chin, N., Nicol, A.F., Jiang, J., Otterson, G., Schmittgen, T.D., *et al.* (2010). Strong inverse correlation between microRNA-125b and human papillomavirus DNA in productive infection. *Diagn Mol Pathol* 19, 135-143.
- Ohbo, K., Sugamura, K., Sekizawa, T., and Kogure, K. (1991). Interleukin-6 in cerebrospinal fluid of HTLV-I-associated myelopathy. *Neurology* 41, 594-595.
- Okochi, K., Sato, H., and Hinuma, Y. (1984). A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang* 46, 245-253.
- Omoto, S., and Fujii, Y.R. (2005). Regulation of human immunodeficiency virus 1 transcription by nef microRNA. *J Gen Virol* 86, 751-755.
- Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., Matsumoto, M., and Tara, M. (1986). HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1, 1031-1032.
- Pais-Correia, A.M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., Gout, O., Alcover, A., and Thoulouze, M.I. (2009). Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med* 16, 83-89.
- Pauley, K.M., Satoh, M., Chan, A.L., Bubb, M.R., Reeves, W.H., and Chan, E.K. (2008). Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 10, R101.
- Perkins, D.O., Jeffries, C.D., Jarskog, L.F., Thomson, J.M., Woods, K., Newman, M.A., Parker, J.S., Jin, J., and Hammond, S.M. (2007). microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Genome Biol* 8, R27.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., *et al.* (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2, 269-276.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., *et al.* (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304, 734-736.
- Pichler, K., Schneider, G., and Grassmann, R. (2008). MicroRNA miR-146a and further oncogenesis-related cellular microRNAs are dysregulated in HTLV-1-transformed T lymphocytes. *Retrovirology* 5, 100.
- Pickford, A.S., and Cogoni, C. (2003). RNA-mediated gene silencing. *Cell Mol Life Sci* 60, 871-882.
- Pinto, M.T., Rodrigues, E.S., Malta, T.M., Azevedo, R., Takayanagui, O.M., Valente, V.B., Ubiali, E.M., Covas, D.T., and Kashima, S. (2012). HTLV-1/2 seroprevalence and coinfection rate in Brazilian first-time blood donors: an 11-year follow-up. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 54, 123-129.
- Pique, C., and Jones, K.S. (2012). Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front Microbiol* 3, 378.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 7415-7419.

- Popovic, M., Reitz, M.S., Jr., Sarngadharan, M.G., Robert-Guroff, M., Kalyanaraman, V.S., Nakao, Y., Miyoshi, I., Minowada, J., Yoshida, M., Ito, Y., *et al.* (1982). The virus of Japanese adult T-cell leukaemia is a member of the human T-cell leukaemia virus group. *Nature* 300, 63-66.
- Popovic, M., Sarin, P.S., Robert-Guroff, M., Kalyanaraman, V.S., Mann, D., Minowada, J., and Gallo, R.C. (1983). Isolation and transmission of human retrovirus (human t-cell leukemia virus). *Science* 219, 856-859.
- Poy, M.N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., Macdonald, P.E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., *et al.* (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432, 226-230.
- Renno, T., Taupin, V., Bourbonniere, L., Verge, G., Tran, E., De Simone, R., Krakowski, M., Rodriguez, M., Peterson, A., and Owens, T. (1998). Interferon-gamma in progression to chronic demyelination and neurological deficit following acute EAE. *Mol Cell Neurosci* 12, 376-389.
- Rocha-Junior, M.C., Haddad, R., Cilio Alves, D.C., de Deus Wagatsuma, V.M., Mendes-Junior, C.T., Deghaide, N.H., Takayanagui, O.M., Covas, D.T., Donadi, E.A., and Kashima, S. Interleukin-18 and interferon-gamma polymorphisms are implicated on proviral load and susceptibility to human T-lymphotropic virus type 1 infection. *Tissue Antigens* 80, 143-150.
- Rossi, R.L., Rossetti, G., Wenandy, L., Curti, S., Ripamonti, A., Bonnal, R.J., Birolo, R.S., Moro, M., Crosti, M.C., Gruarin, P., *et al.* (2011). Distinct microRNA signatures in human lymphocyte subsets and enforcement of the naive state in CD4⁺ T cells by the microRNA miR-125b. *Nat Immunol* 12, 796-803.
- Sabouri, A.H., Saito, M., Usuku, K., Bajestan, S.N., Mahmoudi, M., Forughipour, M., Sabouri, Z., Abbaspour, Z., Goharjoo, M.E., Khayami, E., *et al.* (2005). Differences in viral and host genetic risk factors for development of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis between Iranian and Japanese HTLV-1-infected individuals. *J Gen Virol* 86, 773-781.
- Saxinger, W., Blattner, W.A., Levine, P.H., Clark, J., Biggar, R., Hoh, M., Moghissi, J., Jacobs, P., Wilson, L., Jacobson, R., *et al.* (1984). Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) antibodies in Africa. *Science* 225, 1473-1476.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199-208.
- Seiki, M., Hattori, S., Hirayama, Y., and Yoshida, M. (1983). 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* 80, 3618-3622.
- Shimoyama, M. (1991). Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol* 79, 428-437.
- Sodroski, J. (1992). The human T-cell leukemia virus (HTLV) transactivator (Tax) protein. *Biochim Biophys Acta* 1114, 19-29.
- Sonkoly, E., Stahle, M., and Pivarcsi, A. (2008). MicroRNAs and immunity: novel players in the regulation of normal immune function and inflammation. *Semin Cancer Biol* 18, 131-140.

- Sonoda, S., Li, H.C., and Tajima, K. (2011). Ethnoepidemiology of HTLV-1 related diseases: ethnic determinants of HTLV-1 susceptibility and its worldwide dispersal. *Cancer Sci* 102, 295-301.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.J., and Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 12481-12486.
- Takahashi, Y., Satoh, M., Minami, Y., Tabuchi, T., Itoh, T., and Nakamura, M. (2010). Expression of miR-146a/b is associated with the Toll-like receptor 4 signal in coronary artery disease: effect of renin-angiotensin system blockade and statins on miRNA-146a/b and Toll-like receptor 4 levels. *Clin Sci (Lond)* 119, 395-405.
- Talledo, M., Lopez, G., Huyghe, J.R., Verdonck, K., Adaui, V., Gonzalez, E., Best, I., Clark, D., Vanham, G., Gotuzzo, E., *et al.* Evaluation of host genetic and viral factors as surrogate markers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peruvian HTLV-1-infected patients. *J Med Virol* 82, 460-466.
- Tan, G.S., Garchow, B.G., Liu, X., Metzler, D., and Kiriakidou, M. (2011). Clarifying mammalian RISC assembly in vitro. *BMC Mol Biol* 12, 19.
- Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 19, 517-529.
- Tomita, M., Tanaka, Y., and Mori, N. (2012). MicroRNA miR-146a is induced by HTLV-1 tax and increases the growth of HTLV-1-infected T-cells. *Int J Cancer* 130, 2300-2309.
- Umehara, F., Izumo, S., Nakagawa, M., Ronquillo, A.T., Takahashi, K., Matsumuro, K., Sato, E., and Osame, M. (1993). Immunocytochemical analysis of the cellular infiltrate in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 52, 424-430.
- Umehara, F., Izumo, S., Ronquillo, A.T., Matsumuro, K., Sato, E., and Osame, M. (1994). Cytokine expression in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 53, 72-77.
- Valeri, V.W., Hryniewicz, A., Andresen, V., Jones, K., Fenizia, C., Bialuk, I., Chung, H.K., Fukumoto, R., Parks, R.W., Ferrari, M.G., *et al.* (2010). Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. *Blood* 116, 3809-3817.
- Van Prooyen, N., Gold, H., Andresen, V., Schwartz, O., Jones, K., Ruscetti, F., Lockett, S., Gudla, P., Venzon, D., and Franchini, G. (2010). Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20738-20743.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931-1934.
- Wang, W.X., Rajeev, B.W., Stromberg, A.J., Ren, N., Tang, G., Huang, Q., Rigoutsos, I., and Nelson, P.T. (2008). The expression of microRNA miR-107 decreases early in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J Neurosci* 28, 1213-1223.
- Wattel, E., Vartanian, J.P., Pannetier, C., and Wain-Hobson, S. (1995). Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol* 69, 2863-2868.

- 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., *et al.* (2005). Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7994-7999.
- Yamaguchi, K., and Watanabe, T. (2002). Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. *Int J Hematol* 76 Suppl 2, 240-245.
- Yamamoto, N., Okada, M., Koyanagi, Y., Kannagi, M., and Hinuma, Y. (1982). Transformation of human leukocytes by cocultivation with an adult T cell leukemia virus producer cell line. *Science* 217, 737-739.
- Yamano, Y., Nagai, M., Brennan, M., Mora, C.A., Soldan, S.S., Tomaru, U., Takenouchi, N., Izumo, S., Osame, M., and Jacobson, S. (2002). Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood* 99, 88-94.
- Ye, H., Arron, J.R., Lamothe, B., Cirilli, M., Kobayashi, T., Shevde, N.K., Segal, D., Dzivenu, O.K., Vologodskaya, M., Yim, M., *et al.* (2002). Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 418, 443-447.
- Yeung, M.L., Yasunaga, J., Bennasser, Y., Dusetti, N., Harris, D., Ahmad, N., Matsuoka, M., and Jeang, K.T. (2008). Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. *Cancer Res* 68, 8976-8985.
- Yoshida, M. (2001). Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol* 19, 475-496.
- Zamore, P.D., and Haley, B. (2005). Ribo-gnome: the big world of small RNAs. *Science* 309, 1519-1524.
- Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2003). Sequence requirements for micro RNA processing and function in human cells. *RNA* 9, 112-123.
- Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res* 32, 4776-4785.
- Zhao, H., Ma, B., Wang, Y., Han, T., Zheng, L., Sun, C., Liu, T., Zhang, Y., Qiu, X., and Fan, Q. (2013). miR-34a inhibits the metastasis of osteosarcoma cells by repressing the expression of CD44. *Oncol Rep*.
- Zheng, H., Wolfe, N.D., Sintasath, D.M., Tamoufe, U., Lebreton, M., Djoko, C.F., Dikko, J., Pike, B.L., Heneine, W., and Switzer, W.M. (2010). Emergence of a novel and highly divergent HTLV-3 in a primate hunter in Cameroon. *Virology* 401, 137-145.

Anexos

ANEXOS

ANEXO I – Termo de consentimento livre e esclarecido

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Campus Universitário Monte Alegre
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: *"Perfil quantitativo da expressão de microRNAs em populações de linfócitos T 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 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, podendo levar a um leve desconforto passageiro. Não há riscos decorrentes da pesquisa a não ser o desconforto da picada da agulha na coleta de sangue.

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 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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - Campus Universitário Monte Alegre
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA: *"Perfil quantitativo da expressão de microRNAs em populações de linfócitos T 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 Simone Kashima/ Rochele Azevedo ou 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 II – Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa

Ribeirão Preto, 06 de dezembro de 2006

Ofício nº 3491/2006
CEP/SPC

Prezada Senhora,

O trabalho intitulado **"PERFIL QUANTITATIVO DA EXPRESSÃO DE MICRO RNAs EM POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T DE PACIENTES INFECTADOS PELO HTLV-1"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 238ª Reunião Ordinária realizada em 04/12/2006, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 12352/2006.

Atenciosamente.

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

Ilustríssima Senhora
SIMONE KASHIMA
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto