



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA INTEGRAÇÃO GENÔMICA DO HTLV-I E
DA CLONALIDADE DAS CÉLULAS LEUCÊMICAS NA
LEUCEMIA/ LINFOMA DE CÉLULAS T DO ADULTO
(ATL) NA BAHIA**

ALINE CLARA DA SILVA

**Salvador - Bahia – Brasil
2008**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE E MEDICINA
INVESTIGATIVA**

**ESTUDO DA INTEGRAÇÃO GENÔMICA DO HTLV-I
E DA CLONALIDADE DAS CÉLULAS LEUCÊMICAS
NA LEUCEMIA/ LINFOMA DE CÉLULAS T DO
ADULTO (ATL) NA BAHIA**

ALINE CLARA DA SILVA

Orientador: Dr^a. Lourdes Farré Vallvé

Dissertação apresentada para a
obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa.

Salvador – Bahia

2008

Dedico este trabalho, como tudo mais em minha vida, a minha mãe e minha irmã. Elas serão sempre minhas guias e espelho, e, por elas, conquistarei todos os nossos sonhos!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me agraciado com uma vida repleta de anjos e milagres, por me permitir continuar apesar das adversidades, por me abraçar como filha e mostrar Sua grandiosidade!

À minha orientadora, Dra. Lourdes Farré, por acreditar no meu potencial e não me deixar desistir. Pela disponibilidade, paciência, compreensão, exigência, ética e tudo o mais que ultrapassou a orientação.

Aos chefes de laboratório, Dra. Aldina Barral, Dr. Manoel Barral-Neto e Dr. Zilton Andrade.

Ao Dr. Johan van Weienberg.

Ao CPqGM/FIOCRUZ e à FAPESB pelo suporte financeiro.

Aos professores do Curso de Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

Às secretárias Elze Leite, Mirella Branco e Taise Coutinho.

À equipe do Hospital das Clínicas, especialmente Dra. Achiléa Bittencourt, pelo exemplo de paixão e compromisso com o trabalho e pacientes.

À grande equipe de trabalho e queridos amigos, Tatiana Cunha, Everton Batista, Rodrigo Oliveira e Marcelo Magalhães. Agradeço pelo apoio e ajuda em todos os momentos.

Aos amigos da Plataforma de Seqüenciamento do CPqGM, José Pereira e Daniele Takahashi.

Aos amigos do LIM1, LIP e LAPEX, em especial a Jorge Tolentino, Antônio Carlos Santos, Natali Alexandrino, George, Aline Báfica e Gilvanéia Santos.

Aos amigos que estão longe mas sempre se fazem presente: Diana Santana, Fernanda Cupertino, Mylene Melo, Ana Cácia Freire.

Aos amigos do LGBM, na UESC, principalmente Dr. Abelmon Gesteira e Dra. Fabienne Micheli pela iniciação na ciência e amizade.

À minha grande, sempre presente e atuante família. Vocês são minha base e segurança. À minha avó e meu avô, Armerly e Milton Guimarães, pelo carinho. Às minhas priminhas e companheiras de todas as horas, Oliandra Nicoletti e Lorena Nicoletti. À tia Ângela Nicolleti e tio Olinto Cara, por respeitarem os meus momentos e tentarem me dar um lar com muito amor. À tio João Clara, meu segundo pai, por todo amor dispensado. Aos meus primos Enio Silva e Dhayany Clara pelo abrigo e atenção. E a Artur Góes por me mostrar que, não importa o que aconteça, a vida segue seu rumo, novas vidas surgem, novos laços se formam e o coração deve sempre estar aberto às maravilhas de Deus.

Ao meu pai, Daniel Clara, por seus ensinamentos, por me permitir buscar todos os meus sonhos e sempre deixar as portas abertas. Foi baseada em sua história de vida e sucesso que decidi buscar caminhos tão distintos.

Ao meu irmão, Rafael Clara, o maior milagre da minha vida, o maior coração e exemplo de superação que conheço. Obrigada pelo apoio, cuidado e amor incondicional!

À minha irmã, Juliana Clara, um anjo que Deus enviou à minha vida, minha melhor amiga e grande companheira. Guardiã de todos os meus sonhos e dos meus mais puros sentimentos.

À minha mãe, Dulcimar Guimarães, a mulher mais linda e pura que já existiu. Minha guia, que me ensinou a perseguir meus sonhos e ser quem sou. Minha grande amiga e protetora, meu maior exemplo de amor, dedicação e força.

RESUMO

ESTUDO DA INTEGRAÇÃO GENÔMICA DO HTLV-I E DA CLONALIDADE DAS CÉLULAS LEUCÊMICAS NA LEUCEMIA/ LINFOMA DE CÉLULAS T DO ADULTO (ATL) NA BAHIA. **Aline Clara da Silva.** A leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) constitui uma forma grave de leucemia/ linfoma que ocorre, em geral, na vida adulta e é causada pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-I). O HTLV-I está presente em cerca de 1,8% da população da cidade de Salvador, Bahia, Brasil. No entanto, apenas cerca de 5% dos infectados desenvolvem ATL. O HTLV-I é um retrovírus que integra o seu DNA proviral no DNA genômico da célula hospedeira (principalmente células T CD4+) num local que presume-se randômico e, acredita-se que, para o desenvolvimento da ATL, é necessário ocorrer a expansão clonal das células infectadas. Assim, a detecção da integração proviral e da clonalidade da células leucêmicas são de fundamental importância para o diagnóstico da ATL e definição do tratamento. O presente trabalho buscou identificar os locais de integração do DNA proviral do HTLV-I no DNA da célula hospedeira e o tipo de expansão clonal observada em amostras de PBMC e células de tecido de lesões de pacientes com diagnóstico clínico-patológico de ATL do estado da Bahia. A determinação do sítio de integração do DNA proviral na célula hospedeira foi feita, em 24 pacientes, através das técnicas de IPCR e ILPCR. Estas técnicas permitiram identificar o sítio de integração proviral em pacientes de ATL de diferentes formas clínicas e observou-se que a integração do provírus não ocorreu de forma preferencial em nenhum cromossomo. Em apenas três pacientes houve interrupção de seqüências codificantes e na maioria dos demais pacientes analisados, o provírus integrou-se em regiões próximas aos centrômeros, conhecidas como regiões repetitivas alfaídes. O padrão de clonalidade das células leucêmicas foi determinado, em 36 pacientes, através da análise por PCR do rearranjo dos genes que codificam para a cadeia γ do TCR. Observou-se assim um padrão monoclonal das células T para todos os pacientes com forma clínica aguda. Nas outras formas clínicas, uma pequena percentagem de pacientes apresentou padrão misto ou policlonal. Os resultados obtidos demonstraram que as técnicas utilizadas permitiram determinar o sítio de integração e o padrão de clonalidade das células infectadas pelo HTLV-I em pacientes de ATL e podem ser aplicadas para diagnóstico e acompanhamento dos pacientes de ATL da Bahia.

Palavras-chave: 1. ATL. 2. Expansão clonal. 3. Integração proviral.

ABSTRACT

STUDY OF HTLV-I PROVIRAL INTEGRATION AND T CELL CLONALITY IN ADULT T-CELL LEUKEMIA/LYMPHOMA (ATL) IN BAHIA. **Aline Clara da Silva.** Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) is a severe neoplasm that usually occurs in adults, and that is caused by human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I) infection. In Salvador, Bahia, Brazil, a HTLV-I seroprevalence rate of 1.8% was observed in healthy subjects. However, generally, only 5% of infected individuals develop ATL. HTLV-I is a retrovirus that randomly integrates its proviral DNA into the host genome (specially, T CD4+ cells), and clonal expansion of infected cells is believed to result in the onset of ATL. Therefore, detection of monoclonal provirus integration is important to ATL diagnosis and treatment definition. The aim of this study was to investigate the HTLV-I proviral integration sites and T cell clonality in samples of PBMC and cutaneous biopsies of patients with clinical and histopathologic diagnosis of ATL from Bahia. Using inverse PCR (IPCR and ILPCR) we identified provirus integration sites in PBMC and cutaneous biopsies of 24 patients in diverse clinical subtypes of ATL. No chromosome bias was evident among different patients. In three patients occurred interruption of transcriptional units and in most patients the provirus was integrated in alphoid regions near centrosomes. T-cell clonality was assessed by detection of the rearranged TCR- γ genes. Monoclonal pattern was observed in acute patients. In the other clinical subtypes, small number of patients showed oligoclonal and policlonal patterns. According to these results, we showed that inverse PCR and TCR- γ PCR are efficient for integration site determination and infected cells clonality patterns in ATL patients and could be used in diagnosis and patient follow up in Bahia.

Key-words: 1. ATL. 2: Clonal expansion. 3. Provirus integration.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	O VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS TIPO I.....	12
1.2	DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-I.....	13
1.3	MECANISMOS ONCOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA ATL.....	14
1.3.1	Integração do DNA proviral e desenvolvimento da ATL.....	18
1.3.2	Clonalidade de linfócitos T na ATL.....	19
2	HIPÓTESE	21
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	METODOLOGIA	23
4.1	PACIENTES.....	23
4.2	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	23
4.3	SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC).....	23
4.4	EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DAS PBMCs.....	24
4.5	EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE TECIDO.....	24
4.6	PCR INVERTIDA LONGA (ILPCR).....	24
4.7	PCR INVERTIDA (IPCR).....	27
4.8	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO.....	29
4.9	ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS.....	29
4.10	ANÁLISE DO REARRANJO DOS GENES QUE CODIFICAM PARA A CADEIA β DO TCR.....	30
4.11	ANÁLISE DO REARRANJO DOS GENES QUE CODIFICAM PARA A CADEIA γ DO TCR.....	30
5	RESULTADOS	32
5.1	ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO VIRAL.....	32
5.2	ANÁLISE DA CLONALIDADE DE CÉLULAS T.....	38
5.2.1	Validação dos protocolos para análise do rearranjo dos genes que codificam para o TCR.....	38
5.2.2	Análise da clonalidade de células T em pacientes com ATL.....	39
5.3	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE CLONALIDADE OBTIDOS PELAS TÉCNICAS DE PCR INVERTIDO E ANÁLISE DO REARRANJO DOS GENES QUE CODIFICAM PARA A CADEIA γ DO TCR.....	41
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
	ANEXOS	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Esquema demonstrando os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da ATL, desde a infecção até o surgimento da célula neoplásica.
- Figura 2:** Esquema representando as etapas que compõem a ILPCR.
- Figura 3:** Esquema ilustrando as etapas que compõem a IPCR.
- Figura 4:** Organização dos genes que codificam para a cadeia γ do TCR e regiões reconhecidas pelos primers utilizados na PCR para análise do rearranjo dos mesmos
- Figura 5:** Gel de poliacrilamida 6% com produto de PCR gerado pelas técnicas de IPCR/ILPCR. M: marcador de peso molecular de 100 pb; 1 a 7 pacientes com diagnóstico clínico-patológico de ATL.
- Figura 6:** Análise da sequência de paciente de ATL utilizando a ferramenta BLAST. O local de integração do provírus do HTLV-I no genoma do hospedeiro é flanqueado por DNA proviral.
- Figura 7:** Localização do sítio de integração do DNA proviral do HTLV-I no cromossomo humano, através de ferramentas disponíveis no Ensembl Genome Browser. A figura mostra inserção do provírus no braço longo do cromossomo 7.
- Figura 8:** Mapa cromossômico ilustrando a localização do provírus do HTLV-I nos cromossomos dos pacientes com diagnóstico clínico-patológico de ATL estudados. Os cromossomos onde a integração proviral interrompeu sequências gênicas estão assinalados.
- Figura 9:** Gel de poliacrilamida 10% representando a análise do rearranjo dos genes que codificam para a cadeia γ do TCR. M: Marcador de peso molecular de 100 pb; 1 a 3: controles sadios, 4: MT-2, 5: paciente com diagnóstico clínico-patológico de ATL.
- Figura 10:** Gel de poliacrilamida 10% representando a análise do rearranjo dos genes que codificam para a cadeia β do TCR. M: marcador de peso molecular de 100 pb; 1 e 9: controles da reação; 2 a 8: controles sadios. Os produtos de PCR observados variam entre uma banda bem definida (2, 6 e 8), múltiplas bandas (3 e 5) e padrão misto (4 e 7).

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Localização cromossômica do provírus do HTLV-I no genoma dos pacientes de ATL.
- Tabela 2:** Padrão de clonalidade de células T obtido a partir da análise dos DNAs extraídos do PBMC de pacientes de ATL com diferentes formas clínicas.
- Tabela 3:** Padrão de clonalidade de células T obtido a partir da análise dos DNAs extraídos das biópsias de lesão de pele suspeita em pacientes de ATL.
- Tabela 4:** Padrão clonal determinado através das técnicas de análise dos sítios de integração proviral e do rearranjo dos genes que codificam para a cadeia γ do TCR.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATL	Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto
AZT	Ziduidina
BLAST	Ferramenta de Pesquisa de Alinhamento Local Básico - <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CD	Código de Diferenciação – <i>Cluster of differentiation</i>
DIH	Dermatite Infecciosa Associada ao HTLV-I
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
GLUT-1	Proteína Transportadora de Glicose 1
HAM/TSP	Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV-I
HBZ	<i>HTLV-1 basic leucine zipper factor</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HTLV-I	Vírus Linfotrópico de Células T do Adulto Tipo I
ILPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Invertido e Longa
IPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Invertida
LTR	Seqüências Terminais Repetidas
MLV	Vírus da Leucemia Murina
MTOC	Centro de Organização do Microtúbulo
OCIAD2	Domínio 2 do Antígeno Imunorreativo do Carcinoma Ovariano
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PB	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA ^t	Ácido Ribonucléico Transportador
RPM	Rotações por Minuto
TCR	Receptor de Célula T

1. INTRODUÇÃO

1.1 O VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS TIPO I

O vírus linfotrópico de células T humanas tipo I (HTLV-I) foi isolado, em 1980, de células de linhagem derivadas de paciente com leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) (Poiesz *et al.*, 1980). Estima-se que existem cerca de 10 a 20 milhões de pessoas infectadas por este vírus em todo o mundo. O HTLV-I é endêmico no sudoeste do Japão, nas ilhas do Caribe, na África Central, na América Central, no sudeste dos Estados Unidos e na América do Sul (revisado em Yasunaga e Matsuoka, 2007). No Brasil o número de infectados por HTLV-I é de aproximadamente 2,5 milhões, o que torna o Brasil o país com maior número absoluto de indivíduos positivos para HTLV-I (Carneiro-Proietti *et al.*, 2002). Um estudo realizado com amostras de bancos de sangue revelou que os estados brasileiros com maior prevalência de infecção por HTLV-I são Bahia e Maranhão. Estes estados possuem maior população afro-descendente, reforçando a hipótese de que, na região Nordeste, o vírus tem origem africana e foi trazido durante o tráfico de escravos que ocorreu na colonização portuguesa (Catalan-Soares *et al.*, 2005). Essa hipótese é corroborada ainda por estudos filogenéticos que demonstram que a linhagem do HTLV-I circulante em Salvador tem relação com a encontrada na região sul da África (Mota *et al.*, 2007). Na população de Salvador, foi detectada uma taxa de infecção pelo HTLV-1 de 1,8% (Dourado *et al.*, 2003).

A transmissão do HTLV-I ocorre predominantemente por três vias: vertical, principalmente por intermédio de amamentação; horizontal, através de relação sexual com transmissão mais expressiva do homem para a mulher; e parenteral, via transfusão sanguínea ou uso de perfuro-cortantes contaminados (Blatner e Gallo, 1994). Em Salvador, entre gestantes, observou-se que a amamentação é a mais provável forma de transmissão do vírus seguida pela via sexual (Bittencourt *et al.*, 2001).

A triagem da infecção por HTLV-I é feita, inicialmente, por detecção da presença de anticorpos contra o vírus através do método de ELISA. A confirmação é feita pelo método de *Western blot*, o qual permite a diferenciação entre os tipos I e II do HTLV. Em casos onde não é possível confirmar a infecção pela técnica de *Western blot*, podem ser empregadas técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção do DNA proviral (Ministério da Saúde, 2004).

1.2 DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-I

A infecção por HTLV-I está associada ao desenvolvimento de patologias distintas como dermatite infecciosa associada ao HTLV-I (DIH), paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-I (HAM/TSP) e leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL). Porém, a maioria dos indivíduos infectados (cerca de 90%) permanece assintomática (Soares *et al.*, 2000).

A DIH (LaGrenade *et al.*, 1990) ocorre em 0,4% das crianças infectadas que adquirem o vírus verticalmente. Apresenta-se como eczema agudo em crianças sem episódio anterior de eczema infantil e as lesões predominam no vestíbulo nasal, couro cabeludo, ouvido externo, pescoço, axilas e áreas retroauriculares. Caracterizada por lesões eritemato-pápulo-crostosas associadas à secreção nasal e, por vezes, a lesões papulosas disseminadas, a DIH é frequentemente associada a infecções por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus β -hemolyticus* (Bittencourt e Oliveira, 2005). Acredita-se que a DIH pode estar relacionada com o surgimento de ATL, uma vez que 40% dos pacientes de ATL de Salvador, Bahia, têm uma história de eczema severo na infância (Bittencourt *et al.*, 2007).

A HAM/TSP (Osame *et al.*, 1990) é uma doença inflamatória crônica na qual ocorrem lesões no sistema nervoso central. O quadro clínico é caracterizado por fraqueza crônica e progressiva dos membros inferiores, distúrbios esfinterianos (promovendo dificuldades no esvaziamento da bexiga, incontinência urinária, etc), sinais sensitivos objetivos discretos ou ausentes e síndrome tetrapiramidal. O diagnóstico de HAM/TSP baseia-se na presença de sinais clínicos compatíveis e de anticorpos anti-HTLV-I no soro e no líquido cefalorraquidiano (Bittencourt *et al.*, 2006; Carneiro-Proietti *et al.*, 2002).

A ATL foi descrita em 1977 por Takatsuki *et al.* e constitui uma forma grave de leucemia/linfoma, que ocorre geralmente na vida adulta, não responde a quimioterapia, sendo quase sempre, fatal. A ATL desenvolve-se em cerca de 5% dos indivíduos infectados, a qual manifesta-se, em geral, após um longo período de latência. Este período, no Japão, é de 60 anos (revisado em Yasunaga e Matsuoka, 2007) enquanto que no Brasil a doença manifesta-se uma década antes (Pombo de Oliveira *et al.*, 1995; Barbosa *et al.*, 1999; Bittencourt *et al.*, 2007). Não se sabe o que leva esse pequeno número de indivíduos infectados por HTLV-I a apresentar ATL. Múltiplos fatores podem estar relacionados com o desenvolvimento de ATL, associados ao vírus e ao portador. Polimorfismos na região promotora do TNF- α (Takatsuki *et al.*, 2001) e no promotor do gene Fas (Farre *et al.*, 2008) têm sido relacionados na literatura ao desenvolvimento da ATL. A associação de estudos filogenéticos do vírus e da evolução

clínica dos portadores, assim como de outros estudos genéticos, incluindo aspectos imunológicos, poderiam auxiliar na identificação de possíveis fatores de risco nesse desenvolvimento. Classifica-se a ATL em quatro formas clínicas: aguda, linfoma, crônica e indolente (Shimoyama, 1991). Indivíduos com a forma clínica aguda apresentam elevado número de células leucêmicas, freqüentes lesões de pele, lesões ósseas, lesões viscerais múltiplas, hipercalcemia, infiltração pulmonar, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. A forma linfomatosa é indistinguível de outros tipos de linfoma não-Hodgkin nos aspectos clínicos e histopatológicos e caracteriza-se por linfadenopatia, poucas células linfóides atípicas circulantes no sangue periférico, envolvimento de cadeias ganglionares superficiais ou profundas e, às vezes, lesões de pele. Essas duas formas clínicas são as mais agressivas e com pior prognóstico. Na forma crônica ocorre discreto aumento dos leucócitos podendo existir ainda lesões de pele, envolvimento visceral, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. A forma indolente apresenta poucas células neoplásicas circulantes e lesões de pele sem hipercalcemia, linfadenopatia e envolvimento visceral (Ministério da Saúde, 2004; revisado em Yasunaga e Matsuoka, 2007). Outra forma clínica grave foi descrita por Johno et al. (1992), a forma tumoral primária de pele, a qual tem sido observada entre os pacientes da ATL da Bahia e é caracterizada por lesões tumorais na pele, ausência de linfadenomegalia, linfocitose, leucemia, hipercalcemia e envolvimento de órgãos internos (Bittencourt *et al.*, 2005). Mais um ponto desconhecido na ATL é o que leva à ocorrência de determinada forma clínica e não de outra, ou seja, que fatores estão relacionados com a manifestação da doença sob cada forma clínica. Os critérios para o diagnóstico da ATL são: a presença de células malignas de origem linfóide em sangue periférico ou linfonodo, alterações morfológicas características da doença tais como células com núcleo multilobulado (células com núcleo em flor), antígenos de superfície marcadores de malignidade (CD4+ e CD25+); presença de anticorpos para HTLV-I no soro e identificação de integração do DNA proviral do HTLV-I em padrão monoclonal (Ministério da Saúde, 2004); Takatsuki, 2005; Bittencourt *et al.*, 2007). O tratamento da ATL permanece insatisfatório e diversos protocolos foram descritos tais como uso de anticorpos monoclonais, quimioterapia e transplante de células-tronco. Os melhores resultados foram obtidos com ziduvudina (AZT) e interferon-alfa (Hermine *et al.*, 2002), uma vez que esta combinação inibe a integração do DNA viral e a proliferação celular (Macchi *et al.*, 2003).

1.3 MECANISMOS ONCOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA ATL

O HTLV-I é um vírus envelopado que possui no interior de seu capsídeo duas cópias de RNA de fita simples, com polaridade positiva, associada a uma molécula de RNAt (RNA transportador), que serve como iniciador para a síntese de DNA. Além disso, contém ainda as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (Romanos *et al.*, 2000). O genoma do HTLV-I, com 9,03 kb, possui os genes *gag*, *pol* e *env*, os quais codificam proteínas estruturais, flanqueados por duas seqüências denominadas seqüências terminais repetidas (*long terminal repeats* - LTRs). Tais seqüências contêm os promotores virais e outros elementos regulatórios. A extremidade 3', conhecida como região pX, codifica as proteínas regulatórias tax, rex, HBZ, p12, p13, p30 e p21, as quais estão relacionadas com a oncogenicidade viral e proliferação das células infectadas (revisado em Yasunaga e Matsuoka, 2007).

O HTLV-I pode infectar diversos tipos celulares tais como linfócitos B, linfócitos T, fibroblastos e monócitos (Koyanagi *et al.*, 1993), possuindo um tropismo especial por células T CD4+ (Yasunaga *et al.*, 2001). Uma vez que este vírus pode infectar essa variedade de tipos celulares, seu receptor celular deve ser uma molécula amplamente expressa. A proteína transportadora de glicose 1 (*glucose transport 1 protein* – GLUT-1) (Manel *et al.*, 2003) e a proteoglicana heparina de superfície (*surface heparin proteoglycan*) (Takenouchi *et al.*, 2007) exercem a função de receptores celulares para o HTLV-I.

Após a infecção inicial, especialmente de células T CD4+, o vírus se propaga, principalmente, célula a célula. Nesse tipo de transmissão, o contato entre uma célula infectada com outra não infectada leva a polarização do centro de organização do microtúbulo (*microtubule-organizing center* – MTOC), formando uma “sinapse virológica” entre as células envolvidas. Dessa forma, proteínas e genoma virais acumuladas na superfície de contato são transmitidos para a célula-alvo (Bangham, 2003).

No interior da célula infectada, o RNA do HTLV-I é transcrito em DNA de fita dupla pela enzima viral transcriptase reversa. Durante a síntese do DNA viral as seqüências das extremidades do genoma do HTLV-I são duplicadas, formando a região LTR e originando um fragmento maior que o RNA original (Urnovitz e Murphy, 1996). Após a síntese da fita dupla de DNA, esta é transportada para o núcleo e inserida no DNA celular pela integrase viral, a qual parece ser o principal determinante da seleção do sítio de integração proviral (Derse *et*

al., 2007). A integração do provírus é importante para a expressão eficiente dos genes virais e para replicação do vírus (Romanos *et al.*, 2000). Além disso, a inserção do retrovírus pode influenciar a transcrição de genes distantes até 300 kb (Lazo *et al.*, 1990).

Durante o processo de integração, o DNA viral transcrito reorganiza-se dando lugar ao DNA proviral. Neste momento, o DNA viral perde dois pares de base de cada região LTR do seu genoma e uma pequena seqüência do DNA genômico que o flanqueia é duplicada em seis pares de bases (Derse *et al.*, 2007). A integração do DNA proviral do HTLV-I no genoma da célula hospedeira parece ser randômica (Seiki *et al.*, 1984). A maioria das regiões do genoma do hospedeiro permite integração proviral, porém, retrovírus de diferentes gêneros possuem alvos de integração distintos. Por exemplo, o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV-I) tem preferência por genes ou unidades transcricionais (Schroder *et al.*, 2002) enquanto o vírus da leucemia murina (MLV) integra-se, preferencialmente, perto de sítios de início de transcrição ou regiões de ilhas CpG (Wu *et al.*, 2003).

Uma vez integrado o DNA proviral, proteínas virais como Tax, inicialmente, e HBZ, posteriormente, são expressas e induzem a proliferação e inibição da apoptose das células infectadas através da interação com fatores celulares envolvidos nessas vias. O aumento do número de células infectadas promovida por estes mecanismos está relacionado com a elevação da carga viral (revisado em Matsuoka, 2005).

Estudos oriundos do Japão mostraram que células neoplásicas em pacientes com ATL apresentam mutações em genes supressores de tumores e instabilidade genética. Assim, foi postulado que o contínuo estímulo da proliferação de linfócitos infectados CD4+ durante um longo período de latência, poderia provocar, em alguns casos, o aparecimento e o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas no genoma humano levando à transformação neoplásica da célula hospedeira. Nos pacientes japoneses estudados, as células neoplásicas têm a mesma origem clonal e possuem o DNA proviral do HTLV-I integrado no mesmo local do genoma humano. Esta condição é considerada como integração monoclonal do HTLV-I (Kamihira *et al.*, 2005). Assim, expansão clonal de células infectadas transformadas culminaria no desenvolvimento da ATL (Figura 1).

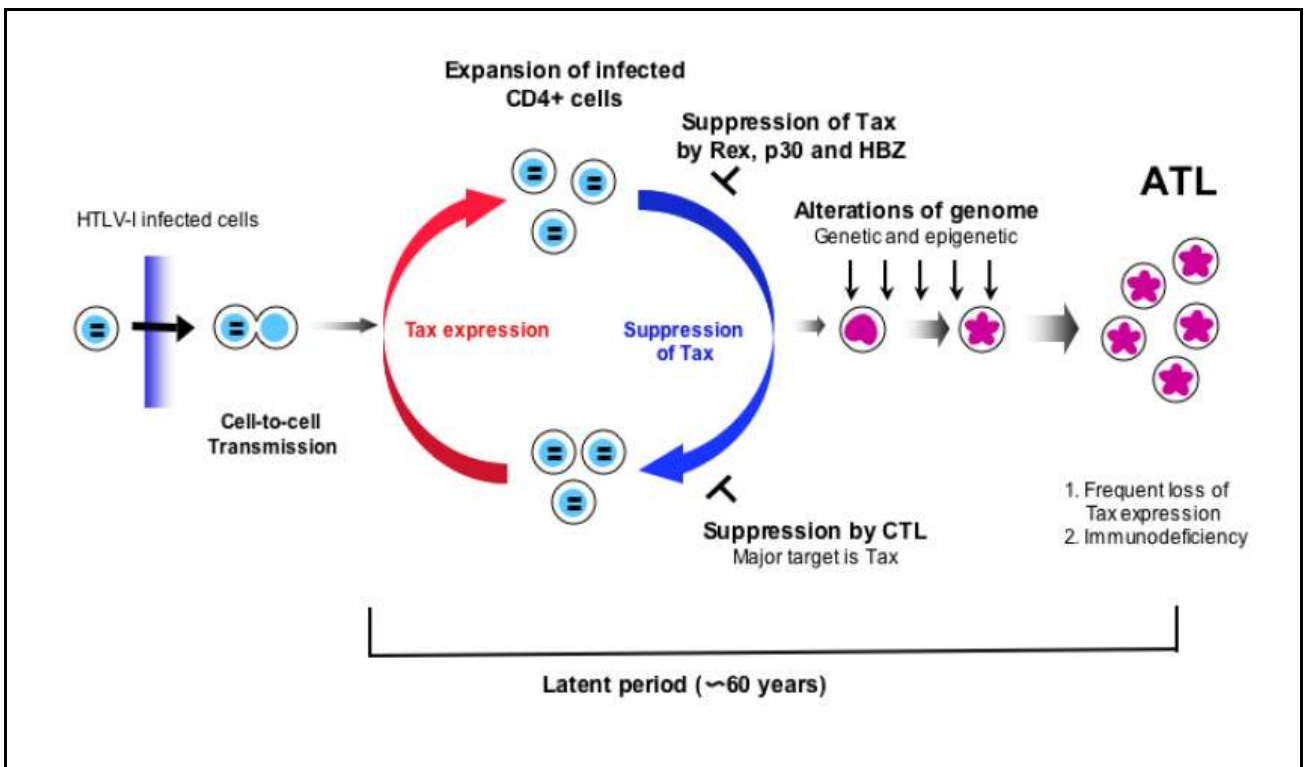


Figura 1: Esquema demonstrando os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da ATL, desde a infecção até o surgimento da célula neoplásica. Fonte: Matsuoka, *Retrovirology* (2005).

1.3.1 Integração do DNA proviral e desenvolvimento da ATL

No início da infecção pelo HTLV-1 existem múltiplas populações de células infectadas cada uma contendo o DNA proviral integrado em um local diferente do genoma (população policlonal). No processo de desenvolvimento da ATL, uma destas populações adquire vantagens proliferativas levando-a a proliferação monoclonal exacerbada, que se caracteriza por apresentar um único local de integração do DNA proviral. Assim, desde o início da infecção do HTLV-I até o desenvolvimento da ATL, a integração do DNA proviral progride de um padrão policlonal para um padrão monoclonal.

Existem poucos dados na literatura sobre a relevância das seqüências humanas interrompidas na transformação neoplásica da célula infectada e posterior desenvolvimento da ATL. O local de integração do provírus poderia estar relacionado com o desenvolvimento da doença se houvesse interrupção de regiões relacionadas com a expressão gênica podendo afetar proteínas importantes na regulação do ciclo celular e da apoptose. Estudos realizados no Japão têm mostrado integração preferencial do provírus do HTLV-I em regiões codificantes: Hanai *et al.* (2004) clonaram 25 sítios de integração de 23 pacientes de ATL e encontraram 13 sítios (52%) dentro de genes; Doi *et al.* (2005) analisaram 56 locais de integração de portadores de HTLV-I e 59 sítios de pacientes de ATL e observaram que, em portadores, as integrações tendem a ocorrer, em sua maioria, em seqüências alféides repetitivas enquanto que, na maioria dos pacientes estudados, as integrações ocorreram próximas a sítios de início de transcrição; Shera *et al.* (2005) observaram que os sítios de integração proviral isolados de linhagens celulares estavam adjacentes a regiões ligadas a matriz nuclear, o mesmo não ocorrendo com células não neoplásicas infectadas.

A determinação do padrão poli ou monoclonal de integração do HTLV-I pode ser feita através da técnica de *Southern blot*, que permite a visualização de um padrão de banda única (monoclonal) ou múltiplas bandas (policlonal). No entanto, tal técnica não permite identificar o local de integração do provírus. O sítio de integração proviral pode ser identificado pela

técnica de PCR invertida (IPCR) ou invertida e longa (ILPCR). Tais técnicas baseiam-se na amplificação e seqüenciamento de parte da região LTR viral e da seqüência de DNA genômico onde aconteceu a integração (Etoh *et al.*, 1997; Takemoto *et al.*, 1994).

1.3.2 Clonalidade de linfócitos T na ATL

Após a infecção, a expressão de genes virais induz a proliferação de múltiplas populações de células T CD4+ infectadas. Esta proliferação exacerbada pode levar a doenças inflamatórias como DIH e HAM/TSP (LaGrenade *et al.*, 1990). Nos portadores assintomáticos também se detectam múltiplas populações de linfócitos infectados, configurando uma expansão policlonal. No entanto, o aparecimento de expansão monoclonal de uma destas populações de linfócitos T CD4+ infectados, em portadores assintomáticos, foi diretamente associada ao desenvolvimento da ATL (Okayama *et al.*, 2004). Assim, estudos feitos no Japão mostraram que, na ATL, as células neoplásicas derivam de um único clone celular. No Brasil, um único trabalho foi publicado mostrando clonalidade de linfócitos T em pacientes de ATL de São Paulo (Sales *et al.*, 2005), mas nenhum estudo foi feito, até o momento, com pacientes da Bahia. No trabalho citado, Sales *et al.* (2005), encontraram expansão monoclonal de células T infectadas em todos os pacientes de ATL analisados (nove pacientes) e em quatro de dezessete portadores assintomáticos de HTLV-I.

A determinação do padrão mono ou policlonal dos linfócitos é fundamental para diferenciação entre lesões linfoproliferativas inflamatórias e linfomas, pois estudos histológicos e imunofenotípicos podem, eventualmente, ser insuficientes para um diagnóstico conclusivo. A detecção de proliferação clonal das células infectadas pode ainda indicar uma fase pré-leucêmica (Assaf *et al.*, 2000). Na ATL o estudo do padrão de expansão clonal é de grande importância para detectar casos de pré-ATL nos portadores assintomáticos e em casos de evolução de DIH para ATL.

Diversos trabalhos têm demonstrado que o rearranjo dos genes que codificam para o receptor de célula T (TCR) pode ser utilizado para diagnóstico de monoclonalidade de linfomas malignos, uma vez que a mais de 98% dos linfomas T contêm um rearranjo único dos genes do TCR (Assaf *et al.*, 2000; Diss *et al.*, 1995; Sales *et al.*, 2005; van Dongen *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 1997). Tal rearranjo consiste na aproximação dos segmentos V, D e J

das cadeias do TCR (cadeias α , β , γ e δ) e confere a diversidade antigênica do TCR (Abbas e Lichtman, 2000).

O processo de rearranjo gênico do TCR acontece durante a fase inicial da diferenciação linfocitária. Durante o período de diferenciação dos linfócitos T, ocorre a diferenciação dos genes que codificam para a cadeia δ do TCR e, em seguida, dos genes da cadeia γ , resultando na expressão do TCR- $\gamma\delta$. Posteriormente, pode haver o rearranjo dos genes da cadeia β , deleção da cadeia δ e subsequente rearranjo gênico da cadeia α , seguida pela expressão do TCR- $\alpha\beta$ (van Dongen *et al.*, 2003).

Durante a proliferação normal das células T, os genes que codificam para o TCR são rearranjados de forma policlonal, de maneira que cada clone de células possui um rearranjo diferente. As células neoplásicas, por sua vez, possuem rearranjos monoclonais, ou seja, sua proliferação ocorre a partir de um clone com o mesmo rearranjo dos genes que codificam para o TCR (Assaf *et al.*, 2000). Assim, o encontro de um rearranjo único dos genes que codificam para o TCR, nas PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) e nas células de lesões de pele suspeitas de malignidade, poderia indicar evolução para ATL e servir como marcador de malignidade.

Para determinar o padrão de clonalidade das células leucêmicas, foi proposta, inicialmente, a técnica de *Southern blot* através da análise do rearranjo dos genes da cadeia β do TCR, uma vez que a maioria das células T possui elevada expressão de TCR- β . Apesar deste método ser capaz de detectar populações clonais de células T em diversos tipos de linfoma, a baixa sensibilidade, o longo período de execução, a grande quantidade de DNA e a utilização de sondas radioativas dificultaram sua utilização como ferramenta de diagnóstico (Assaf *et al.*, 2000). Assim, a técnica de PCR tem sido aplicada para este fim uma vez que supre as limitações observadas na técnica de *Southern blot* (Sales *et al.*, 2005).

A amplificação da cadeia α do TCR não é utilizada para determinação do padrão clonal das células leucêmicas devido a sua complexidade. De forma semelhante, a análise do TCR- δ não é viável, pois este é frequentemente deletado nas células T maduras (Diss *et al.*, 1995). A utilização da técnica de PCR para análise do rearranjo dos genes que codificam a cadeia β do TCR é considerada difícil devido a necessidade de *primers* para todos os segmentos variáveis (65) e de junção (13). Em contrapartida, a análise do TCR- γ é considerada mais simples graças a configuração de seus genes e a grande homologia entre os segmentos gênicos das cadeias $V\gamma$ e $J\gamma$ (Kranz *et al.*, 1985). Além disso, o rearranjo dos genes da cadeia γ do TCR ocorre tanto em precursores da linhagem de TCR- $\alpha\beta$ quanto de TCR- $\gamma\delta$, ou seja, independentemente da linhagem de células T (van Dongen *et al.*, 2003).

2. HIPÓTESE

A integração do DNA proviral do HTLV-1 em regiões relacionadas com a regulação da proliferação celular e da apoptose pode contribuir para a expansão monoclonal dos linfócitos infectados.

3. OBJETIVOS

Estudar a integração do DNA proviral do HTLV-I no DNA da célula hospedeira e o tipo de expansão clonal observada em pacientes com diagnóstico clínico-patológico de ATL.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o tipo de integração do DNA proviral do HTLV-I nas PBMCs e nas lesões cutâneas pela técnica de ILPCR ou IPCR em pacientes com diagnóstico clínico-patológico de ATL.
- Seqüenciar e identificar o gene ou a região intergênica onde o provírus está inserido no genoma da célula hospedeira;
- Estudar a clonalidade das células infectadas analisando o rearranjo dos genes que codificam para o receptor TCR.
- Estudar a possível correlação entre o lugar de integração proviral, a clonalidade das células leucêmicas e a evolução clínica.

4. METODOLOGIA

4.1 PACIENTES

Foram analisados os DNAs extraídos de 36 pacientes (18 do sexo feminino e 18 do sexo masculino) com diagnóstico clínico-patológico de ATL. A idade média dos pacientes foi 44.2 anos (entre 13 e 76 anos) e, segundo a cor da pele, 50% dos pacientes eram negros e os demais eram pardos. Em todos os pacientes extraiu-se DNA das PBMCs, cinco tiveram DNA extraído tanto de PBMCs quanto de células de lesão linfomatosa de pele (diagnóstico anátomopatológico). Foram estudados dez pacientes com a forma clínica aguda, seis com a forma linfomatosa, dois com a forma tumoral primária de pele, quatro com crônica e 14 com indolente.

Todos os pacientes concordaram em participar do projeto, assinando o termo de livre consentimento informado (Anexo A) aprovado pelo comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (HUPES/UFBA).

4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Os pacientes doaram 20 mL de sangue periférico, após consentimento livre e informado. As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa através do sistema de coleta a vácuo (Vacutainer Franklin Lakes-NJ-EUA) em tubos heparinizados.

As biópsias das lesões de pele linfomatosas foram feitas com *punch* por dermatologistas do Serviço de Dermatologia do Ambulatório Magalhães Neto do HUPES/UFBA.

4.3 SEPARAÇÃO DAS PBMCs

Para separação das células mononucleares do sangue periférico utilizou-se 20 mL de sangue heparinizado (10UI/mL) diluído 1:1 com solução salina a 0,9%. Em seguida adicionou-se Ficoll-Hypaque (Ficoll-Paque Plus-GE Healthcare) na proporção 2:1 e centrifugou-se a 1500 rpm por 40 minutos. O anel de células formado após centrifugação foi coletado e as células foram lavadas duas vezes com solução salina a 0,9%, centrifugando-se a 1000 rpm por 10 minutos. Na última lavagem, as células foram contadas em câmara de Neubauer e separadas para extração de DNA.

4.4 EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DAS PBMCs

A extração de DNA genômico das células mononucleares obtidas a partir do gradiente de Ficoll-Hypaque foi feita utilizando-se um protocolo de tratamento com proteinase K e extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico.

O pellet de células foi ressuscitado em 250 µL de solução Tris 10mM – EDTA 10mM - NaCl 0,15 M (TEN 10-10-0,15), 7,4 µL de SDS 20% e 10 µL de proteinase K 10 mg/mL. Essa solução foi incubada a 65°C por 2 horas. Em seguida adicionou-se 250 µL de Tris 10mM - EDTA 10mM - NaCl 0,65 M (TEN 10-10-0,65) e 250 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Agitou-se vigorosamente e centrifugou-se a 10.000 x g por 5 minutos. Após a centrifugação recuperou-se a fase aquosa e adicionou-se 1 mL de etanol absoluto para precipitação do DNA. O tubo foi então homogeneizado e centrifugou-se 10.000 x g por 20 minutos. O pellet foi lavado em etanol 70% e ressuscitado em água. As amostras de DNA obtidas foram quantificadas por espectrofotometria (GeneQuant) e acondicionadas a -20°C.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE TECIDO

Para extração de DNA genômico dos tecidos de lesões de pele dos pacientes de ATL, utilizou-se o protocolo de tratamento com proteinase K e extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, como descrito acima. Durante o tratamento com proteinase K, no entanto, foram necessárias macerações do material e maior período de incubação até que o tecido fosse completamente digerido.

4.6 PCR INVERTIDA LONGA (ILPCR)

Para amplificar o DNA genômico adjacente ao sítio de integração do HTLV-I utilizou-se ILPCR de acordo com Etoh *et al.* (1997). Foram necessários 2 µg de DNA, 2 µL de tampão contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) / MgCl₂ 10 mM / NaCl 100 mM, 10 U da enzima de restrição *EcoRI* e água para um volume final de 20 µL. A solução foi incubada a 37°C por 12 a 16 horas e, posteriormente, incubou-se a 65°C por 10 minutos para inativação da enzima. Para promover a autoligação do fragmento gerado na digestão com a enzima *EcoRI*, a qual possui sítios de restrição no DNA genômico, adicionou-se 20 µL de tampão composto por Tris-HCl 50 mM (pH 7,6) / MgCl₂ 250 mM / ATP 5 mM / DTT 5 mM, 1 U da enzima T4 DNA ligase e 59 µL de água. Incubou-se a solução a temperatura ambiente por 12 a 16 horas. Em seguida, a reação foi submetida a precipitação utilizando-se 30 µL de acetato de sódio 3M e 1 mL de etanol absoluto. Esta solução foi acondicionada a -70°C por 2 horas e centrifugada por 15 minutos a 12.000 rpm. O pellet foi lavado com etanol 70%, centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpm e ressuspendido em 17 µL de água. O DNA sofreu nova digestão com a enzima *MluI*, a qual possui sítio de restrição na região pX do DNA proviral, prevenindo assim, a amplificação do provírus. Para isso utilizou-se 10 U da enzima *MluI*, 2 µL de tampão contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) / MgCl₂ 10 mM / NaCl 100 mM e incubou-se por 12 a 16 horas, a 37°C.

A solução resultante foi submetida a reação de PCR utilizando os *primers* 5'-TGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTG-3' e 5'-AGTCTGGCCCCTGACCTTTTCAGACTTCTGTTTC-3'. Estes *primers* anelam-se às regiões U5 e U3 da região LTR do DNA proviral, respectivamente. Usou-se cerca de 1 µL da reação, 0,5 U de Taq polimerase, 0,2 µM de cada *primer*, 200 µM de dNTPs, tampão contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) / MgCl₂ 10 mM / NaCl 100 mM, num volume final de 25 µL. As reações foram amplificadas em termociclador Eppendorf com as seguintes condições de temperatura: 92°C por 3 minutos para desnaturação do DNA, 56°C ou 58°C por 30 segundos para anelamento dos *primers* e 72°C por 30 segundos para extensão do *primer* pela Taq DNA polimerase durante 40 ciclos. A figura 2 ilustra as etapas que compõem a técnica aqui descrita.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida 6% corados com brometo de etídio, após eletroforese. As amostras que apresentaram apenas uma banda foram purificadas com QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) e seqüenciadas.

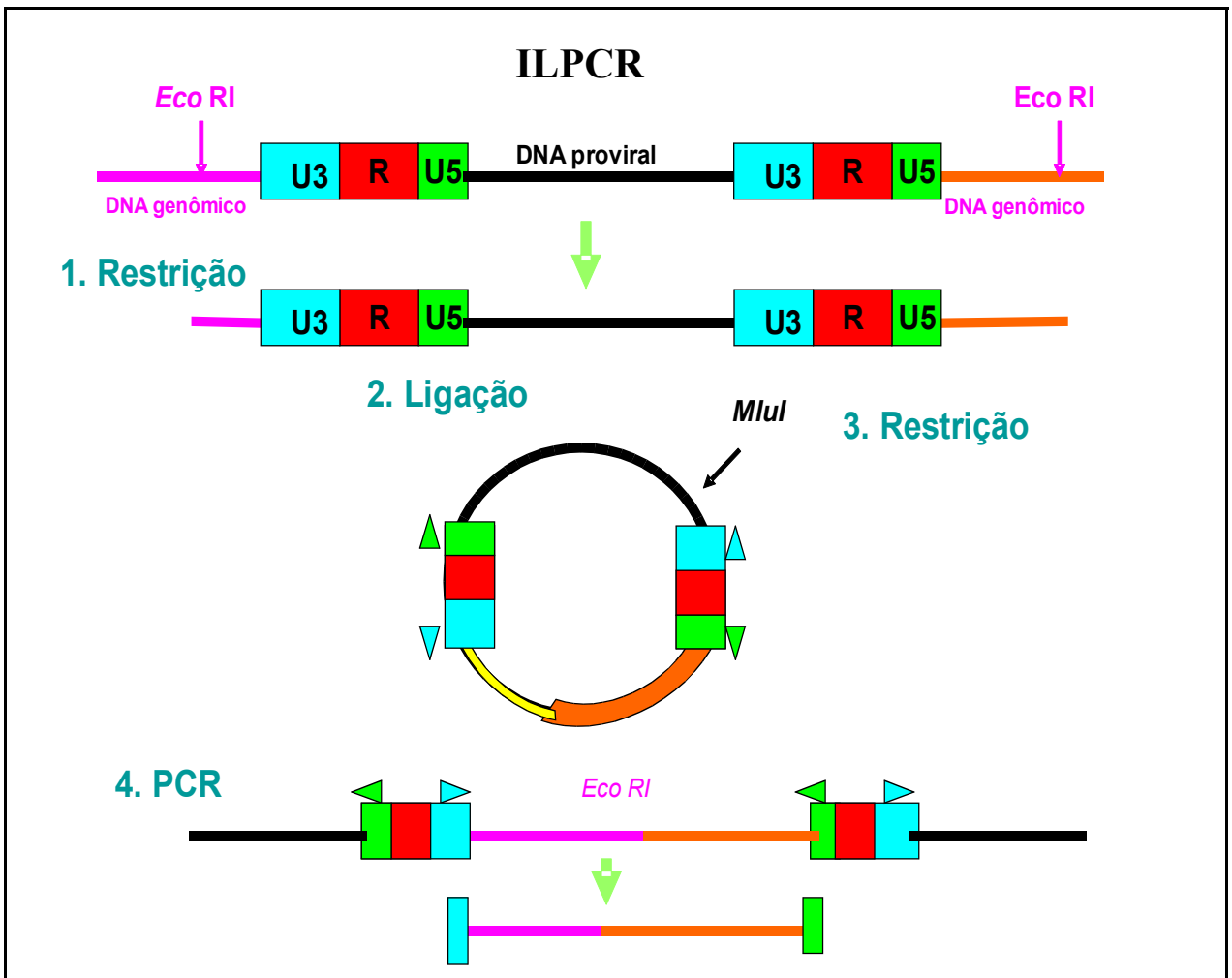


Figura 2: Esquema representando as etapas que compõem a ILPCR.

4.7 PCR INVERTIDA (IPCR)

A metodologia empregada para a IPCR baseia-se em Takemoto *et al.* (1994) e está ilustrada na figura 3. Inicialmente, 1µg de DNA genômico foi digerido, a 37°C por 12 a 16 horas, com 1 U da enzima de restrição *Alu* I, a qual possui sítios de restrição tanto no DNA proviral quanto no DNA genômico, 2 µL de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) / MgCl₂ 10 mM e água para um volume final de 20 µL. A reação foi então submetida a uma auto-ligação utilizando-se 1 U da enzima T4 DNA ligase, 20 µL de tampão com Tris-HCl 50 mM (pH 7,6) / MgCl₂ 250 mM / ATP 5 mM / DTT 5 mM e 59 µL de água. Essa solução foi incubada a temperatura ambiente, por um período de 12 a 16 horas. O DNA ligado foi submetido a uma nova digestão com a enzima de restrição *Sac* II para eliminar o DNA circular originado a partir da extremidade 5' do DNA proviral. Para isso, utilizou-se 1 U da enzima *Sac* II, tampão com Tris-acetato 20 mM / acetato de potássio 50 mM / acetato de magnésio 10 mM / ditioteitol 1 mM e incubou-se a 37°C por 12 a 16 horas..

O DNA digerido foi utilizado em reação de PCR com tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) / MgCl₂ 10 mM / NaCl 100 mM, 200 µM de dNTPs, 1 U de Taq polimerase e 200 nmol/L de cada *primer* num volume final de 50 µL. As seqüências dos *primers* empregados nesta etapa foram 5'-AAGCCGGCAGTCAGTCGTGA-3' e 5'-AAGTACCGGCAACTCTGCTG-3'. Uma nova PCR (Nested PCR) foi realizada com 5 µL do produto da PCR descrita acima, empregando-se as mesmas condições e os seguintes *primers*: 5'-GAAAGGGAAAGGGGTGGAAC-3' e 5'-CCAGCGACAGCCCATCTAT-3'. Cada reação foi amplificada em termociclador Eppendorf e as temperaturas utilizadas foram 94°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos. Na primeira PCR foram necessários 50 ciclos enquanto que no Nested PCR, 35 ciclos.

Os produtos da PCR descrita foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e visualizados em luz ultravioleta, após corado com brometo de etídio.

Quando detectada apenas uma banda nas amostras amplificadas, estas foram purificadas utilizando-se QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) e encaminhadas para seqüenciamento.

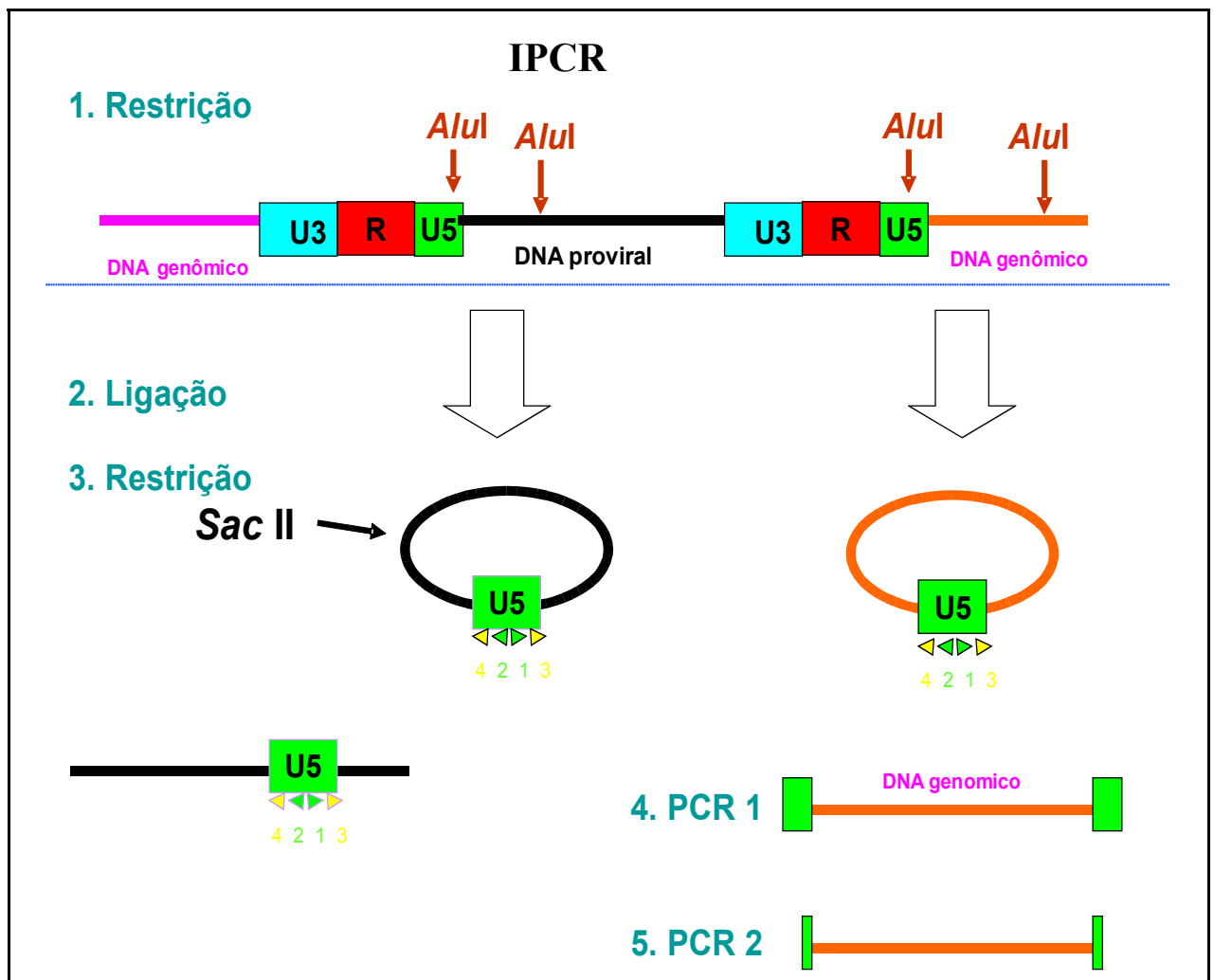


Figura 3: Esquema ilustrando as etapas que compõem a IPCR.

4.8 REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO

As amostras selecionadas para seqüenciamento foram submetidas a reação composta por, aproximadamente, 100 ng de DNA, 3 pmol de *primer*, 2 µL de big dye e 2 µL de tampão com Tris-HCl 200 mM (pH 9,0) / MgCl₂ 5 mM em volume final de 10 µL. As soluções foram amplificadas em termociclador Eppendorf durante 35 ciclos de 96°C por 2 minutos, 52°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após amplificação, as soluções foram precipitadas utilizando-se 80 µL de isopropanol 80% e deixando-se descansar por 20 minutos em temperatura ambiente. Centrifugou-se a placa contendo as amostras por 45 minutos a 4000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Deu-se um spin invertido na placa e adicionou-se 100 µL de etanol 70%, centrifugou-se por 15 minutos a 4000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Deixou-se a placa secar, em ambiente escuro, por, no mínimo, 2 horas e adicionou-se 10 µL de formamida.

As amostras foram então encaminhadas a Plataforma de Seqüenciamento do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) e seqüenciadas no aparelho ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

4.9 ANÁLISE DE SEQÜÊNCIAS

As seqüências nucleotídicas obtidas a partir do seqüenciamento dos produtos das reações de ILPCR e IPCR foram analisadas quanto a sua similaridade com seqüências presentes no banco de dados do GenBank. Para isso, utilizou-se a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1990), disponível na rede do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Assim, foi possível identificar a região genômica onde o DNA proviral estava integrado, bem como o cromossomo em que ocorreu a integração. A localização cromossômica foi feita ainda utilizando-se outra ferramenta

relacionada ao GenBank, o Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org), o qual permite a visualização da região interrompida por DNA proviral no cromossomo humano.

Para que os resultados obtidos após o seqüenciamento fossem considerados satisfatórios as seqüências analisadas deveriam conter seqüências nucleotídicas humanas flanqueadas por seqüências virais.

4.10 ANÁLISE DO REARRANJO DOS GENES QUE CODIFICAM PARA A CADEIA β DO TCR

A técnica aplicada para análise do rearranjo gênico do TCR- β foi descrita por Diss *et al.* (1995) e os *primers* utilizados foram 5'-TCATGGTGTAACATTGTGGGGAC-3' e 5'-AGCACCGTGAGCCTGGTGCC-3'. Estes *primers* eram referentes as regiões D e J do TCR- β .

A reação de PCR utilizou cerca de 100 ng de DNA, 1 U de Taq DNA polimerase, 10 ng de cada *primer*, 400 μ M de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂ e tampão contendo Tris-HCl 20mM (pH 8,4) / KCl₂ 50mM num volume final de 50 μ L. As reações foram amplificadas em termociclador Eppendorf com as seguintes condições de temperatura: 95°C por 3 minutos para desnaturação do DNA, 55°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C por 2 minutos para extensão do *primer* pela Taq DNA polimerase durante 40 ciclos.

Os fragmentos obtidos após a amplificação possuíam entre 55 e 100 pares de bases. Os produtos das reações foram aplicados em gel de poliacrilamida 10% e submetidos a eletroforese. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados em luz ultravioleta.

4.11 ANÁLISE DO REARRANJO DOS GENES QUE CODIFICAM PARA A CADEIA γ DO TCR

A metodologia empregada baseou-se no trabalho de Diss *et al.* (1995) e, para tal, utilizaram-se as seqüências de *primers* V γ I: 5'-TCTGGG/CTCACACTCC/TCACTTC-3'; V γ III/IV: 5'-CTCACACTCC/TCACTTC-3' e J γ 1/2: 5'-CAAGTGTTGTTCCACTGCC-3'. Estes *primers* correspondem a oligonucleotídeos degenerados que se ligam a genes que codificam para as cadeias variáveis do TCR. O *primer* V γ I reconhece todos os genes da

família V γ I, o *primer* V γ III/IV se liga a genes das famílias V γ III e V γ IV (genes V10 e V11) e o *primer* J γ 1/2 é complementar a V γ I e V γ II (Figura 4).

Para as reações de PCR utilizou-se 100 ng de DNA, 1 U de Taq DNA polimerase, 10 ng de cada *primer*, 400 μ M de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂ e tampão contendo Tris-HCl 20mM (pH 8,4) / KCl₂ 50mM num volume final de 50 μ L. As reações foram amplificadas em termociclador Eppendorf com as seguintes condições de temperatura: 95°C por 5 minutos para desnaturação do DNA, 55°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 73°C por 1 minuto para extensão do *primer* pela Taq DNA polimerase durante 40 ciclos.

Os produtos das reações foram aplicados em gel de poliacrilamida 10% e submetidos a eletroforese. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados em luz ultravioleta. Os fragmentos obtidos possuíam entre 70 e 95 pares de bases.

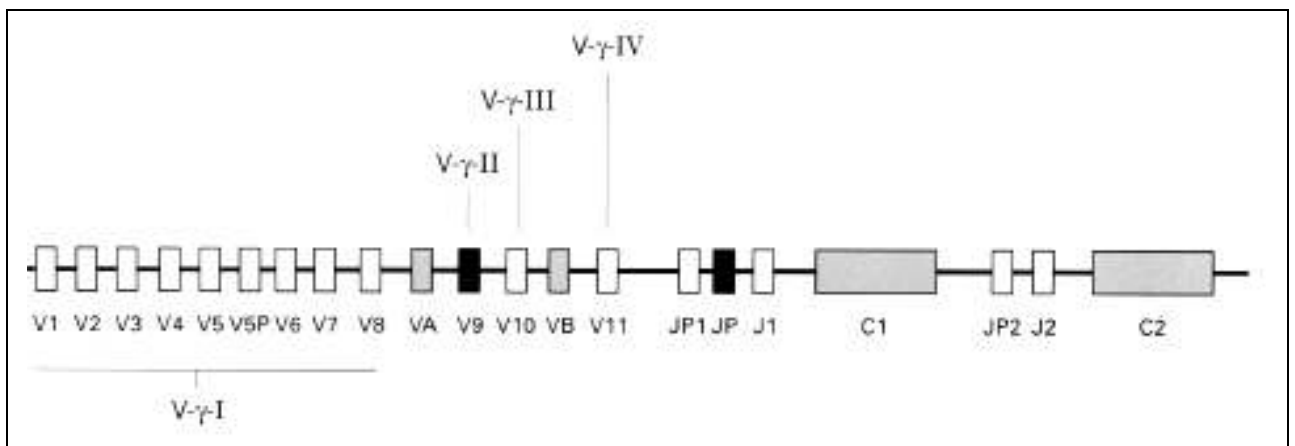


Figura 4: Organização dos genes que codificam para a cadeia γ do TCR e regiões reconhecidas pelos *primers* utilizados na PCR para análise do rearranjo dos mesmos. Fonte: Diss et al., J. Clin. Pathol. (1995).

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO VIRAL

Foram incluídos no estudo da análise da integração viral 24 pacientes com diagnóstico clínico-patológico de ATL. Destes, cinco eram de forma clínica aguda, quatro da linfomatosa, um da tumoral primária de pele, quatro da crônica e dez da clínica indolente. Em dois casos foi possível analisar amostras de DNA extraídas tanto das PBMCs quanto das células das lesões de pele, em outros dois casos, analisou-se DNA extraído apenas de células de lesões de pele e, nos demais, analisou-se apenas o DNA extraído das PBMCs.

As técnicas de IPCR e ILPCR foram otimizadas paralelamente. Nos 24 pacientes estudados, o produto gerado por estas técnicas resultou em uma única banda, quando visualizada em gel de poliacrilamida. Em dois pacientes, obteve-se resultado satisfatório utilizando a IPCR enquanto que para os demais apenas encontrou-se resultado satisfatório através da técnica de ILPCR. Na figura 5 pode-se observar a fotografia de um gel de poliacrilamida com os produtos da PCR invertida de sete dos pacientes analisados.

As 19 bandas geradas através das técnicas de PCR invertida (17 bandas amplificadas do PBMC de 17 pacientes mais duas bandas amplificadas de células de lesão de pele de dois destes pacientes) foram purificadas, seqüenciadas e posteriormente analisadas usando o programa BLAST disponível na rede do NCBI, o qual permitiu pesquisar a presença de seqüências do genoma humano e do DNA proviral do HTLV-I. Destes 17 pacientes, quatro eram da forma clínica aguda, dois da forma clínica linfomatosa, um da tumoral primária de pele, dois da crônica e oito da indolente. Nas 19 bandas observaram-se a presença de seqüências humanas e virais, seguindo o padrão mostrado na figura 6.

Assim, nos 17 pacientes em que foram observadas seqüências humanas e virais, a presença de uma banda como produto de PCR indicou padrão de integração monoclonal do provírus do HTLV-I no genoma do hospedeiro.

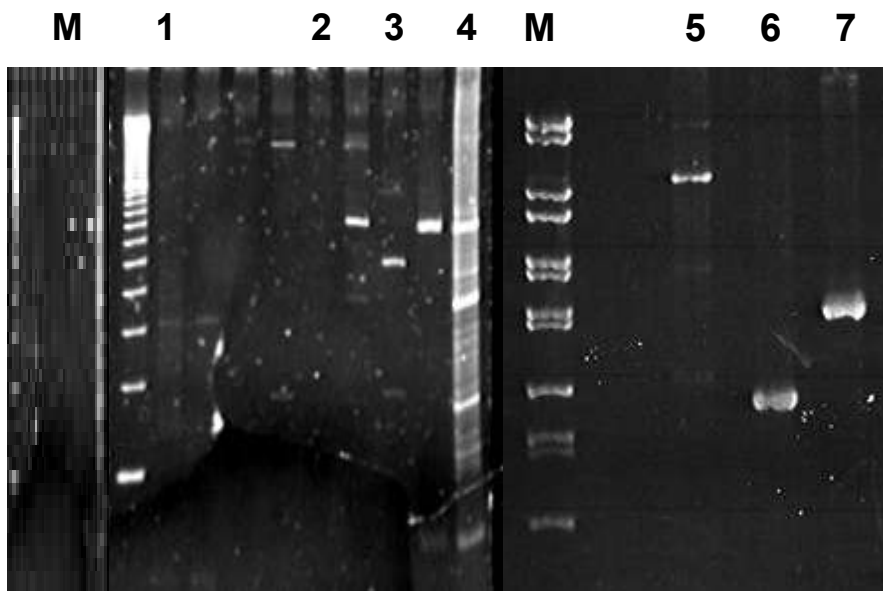
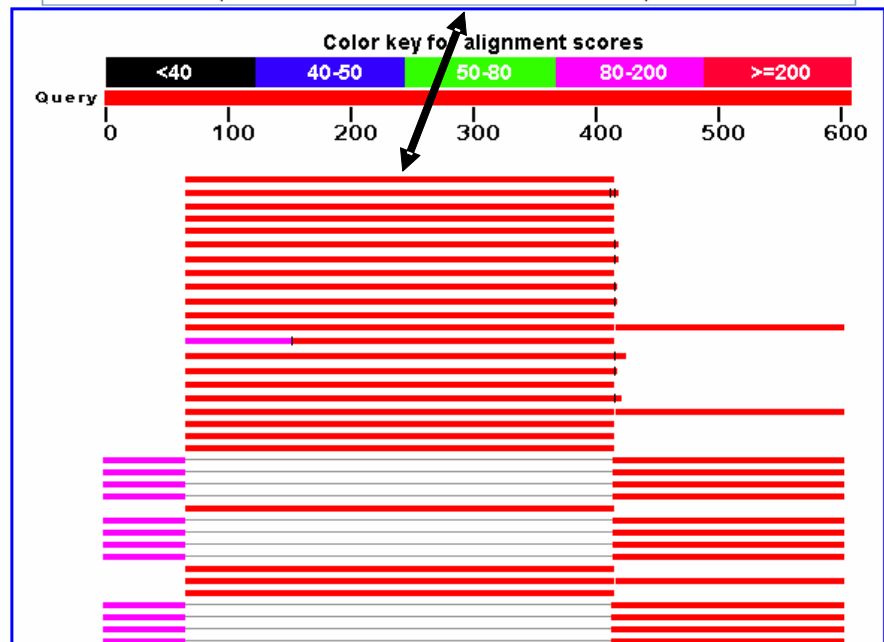


Figura 5: Gel de poliacrilamida 6% com produto de PCR gerado pelas técnicas de IPCR/ILPCR. Na figura observa-se a ocorrência de uma única banda para cada paciente analisado. M: marcador de pares de base (100 pb); 1 a 7: pacientes com diagnóstico clínico-patológico de ATL.

Distribution of 1544 Blast Hits on the Query Sequence

AC036178 Homo sapiens chromosome 18, clone RP11-666N19, complete.. S=422 E=9.8e-11



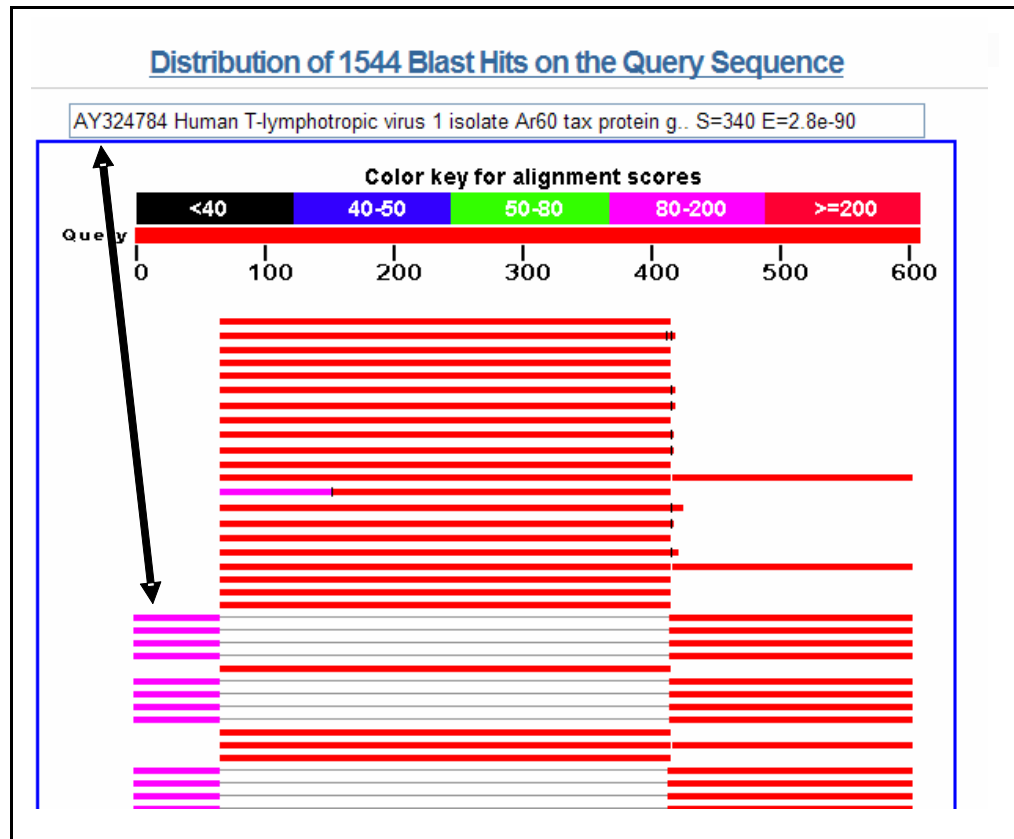


Figura 6: Análise da seqüência da banda obtida por ILPCR do paciente 1 utilizando a ferramenta BLAST, onde se observa a inserção do DNA proviral do HTLV-1 no genoma humano. As setas indicam seqüência do genoma humano (A) e seqüência viral (B).

Nos sete pacientes restantes também se obteve uma única banda, mas o seqüenciamento destas revelou apenas seqüências humanas (em três casos) ou somente seqüências virais (em quatro casos). Essas bandas foram avaliadas como não informativas, pois a presença de DNA proviral flanqueando DNA genômico foi utilizada como critério de validação dos resultados obtidos após seqüenciamento, uma vez que foram utilizados *primers* virais para amplificar um fragmento que deveria conter seqüências virais e humanas e considerando que a técnica de PCR pode apresentar amplificação cruzada. Assim sendo, estas bandas foram desconsideradas e será feita, posteriormente outra análise.

A análise das 19 seqüências informativas, procedentes das 19 amostras contendo seqüências humanas e virais, de acordo com o resultado gerado pelo programa BLAST, permitiu a identificação de 18 sítios de integração do DNA proviral do HTLV-I.

As localizações cromossômicas dos sítios de integração do provírus do HTLV-I estão descritas na tabela 1. Observou-se integração nos cromossomos 1, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 15, 18, 19, 21 e X. Nos cromossomos 4, 7, 8 e 11 encontraram-se sítios de integração do DNA proviral de dois pacientes distintos, enquanto que, no cromossomo 6, três pacientes apresentaram

locais de integração. Assim, não houve integração proviral preferencial em nenhum cromossomo. No cromossomo 6, o sítio de integração proviral foi o mesmo para dois pacientes distintos. Em um dos pacientes, nos quais se analisou simultaneamente a integração proviral no DNA extraído das PBMCs e das células de lesão de pele, encontrou-se integração proviral no mesmo local enquanto que no outro observaram-se locais de integração em cromossomos diferentes. Em um paciente o sítio de integração do DNA proviral ocorreu em uma região com seqüências dos cromossomos 5 e 8.

Utilizando as ferramentas disponíveis no Ensembl Genome Browser, localizou-se a posição da integração do provírus do HTLV-I dentro do cromossomo (figura 7). Em oito pacientes analisados (47%), o DNA proviral estava integrado em regiões próximas ao centrômero, interrompendo regiões alfoídes, enquanto que em três pacientes observou-se a interrupção de seqüências codificantes. Os genes interrompidos foram GLIS3 (gene similar a GLI3) no cromossomo 9, OCIAD2 (domínio 2 do antígeno imunorreativo do carcinoma ovariano) no cromossomo 4 e parte da região aberta de leitura 210 do gene c6orf210 no cromossomo 6. Nas outras sete amostras, o DNA proviral integrou-se em regiões sem funcionalidade conhecida (figura 8).

Tabela 1: Localização cromossômica do provírus do HTLV-I no genoma dos pacientes de ATL.

Paciente	Localização cromossômica	Forma clínica
1	18	Aguda
2	X	Aguda
3	4	Aguda
4	8	Aguda
5	7	Linfoma
6	7	Linfoma
6 (Tecido)	7	Linfoma
7	9	Crônica
8	6	Crônico
9	6	Indolente
10	21	Indolente
10 (Tecido)	6	Indolente
11	11	Indolente
12	11	Indolente
13	19	Indolente

14	15	Indolente
15 (Tecido)	4	Indolente
16 (Tecido)	5/8	Indolente
17	1	Tumoral primária de

pele



Figura 7: Localização do sítio de integração do DNA proviral do HTLV-I no cromossomo humano, através de ferramentas disponíveis no Ensembl Genome Browser. A figura mostra inserção do provírus no braço longo do cromossomo 7.

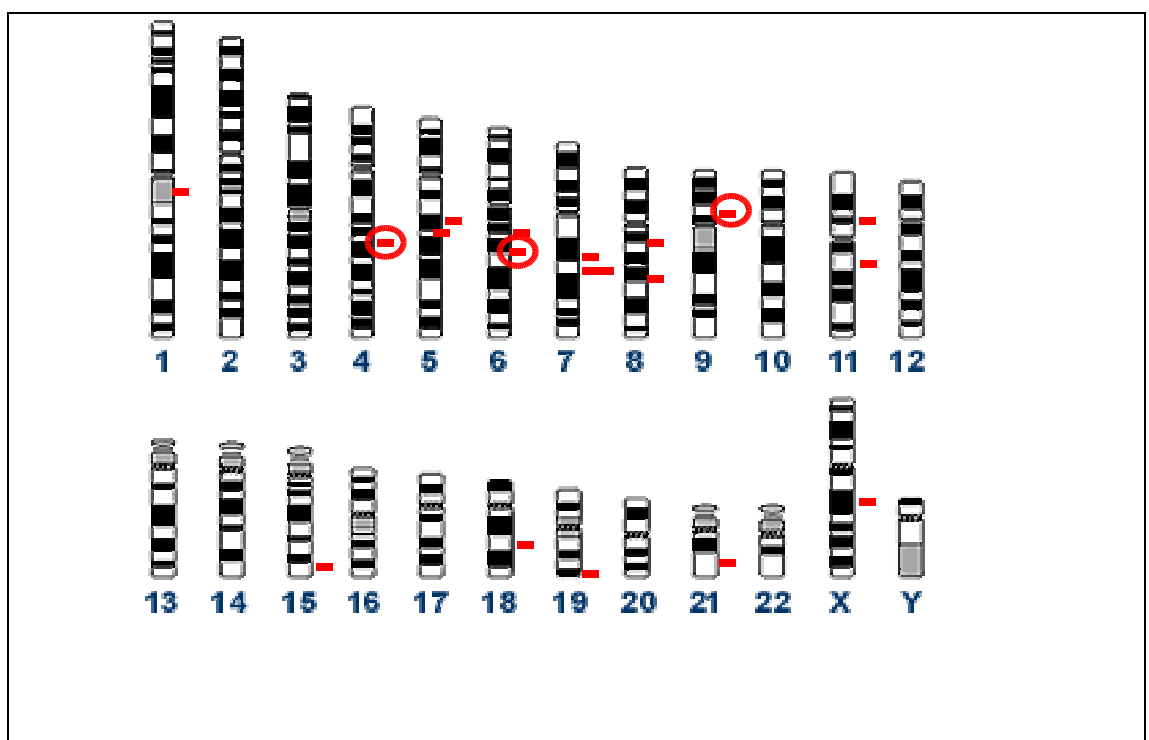


Figura 8: Mapa cromossômico ilustrando a localização do provírus do HTLV-I nos cromossomos dos pacientes estudados com diagnóstico clínico-patológico de ATL. Estão assinalados os cromossomos onde a integração proviral interrompeu seqüências gênicas.

5.2 ANÁLISE DA CLONALIDADE DE CÉLULAS T

5.2.1 Implementação dos protocolos para análise do rearranjo dos genes que codificam para o TCR

Inicialmente foram testados protocolos publicados para a análise das cadeias β e γ do TCR. Para este fim, comparou-se os resultados obtidos utilizando DNAs extraídos de controles sadios, da linhagem celular MT-2 e de pacientes de DIH e ATL.

A avaliação do rearranjo dos genes que codificam para o TCR- γ , segundo o protocolo descrito por Diss *et al.* (1995), foi inicialmente utilizada para a análise de linfomas T e leucemias não associadas ao HTLV-I. No entanto, a aplicação desta metodologia, no presente trabalho, permitiu a diferenciação entre controles negativos (doadores normais) e pacientes de DIH dos pacientes de ATL e de linhagem celular MT-2. Quando os produtos de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida, observou-se um padrão de múltiplas bandas, semelhante a um rastro, para os controles negativos e pacientes de DIH enquanto que, em pacientes de ATL e na linhagem celular MT-2, observou-se o padrão de uma ou duas bandas discretas (Figura 9). Portanto, esta foi a metodologia escolhida para a análise da clonalidade das células leucêmicas. Foram consideradas monoclonais quanto ao padrão de expansão das células leucêmicas, as amostras cujos produtos de PCR, visualizados em gel de poliacrilamida, apresentaram uma ou duas bandas bem definidas, enquanto a presença de rastro foi avaliada como padrão policlonal.

M 1 2 3 4 5 6 7

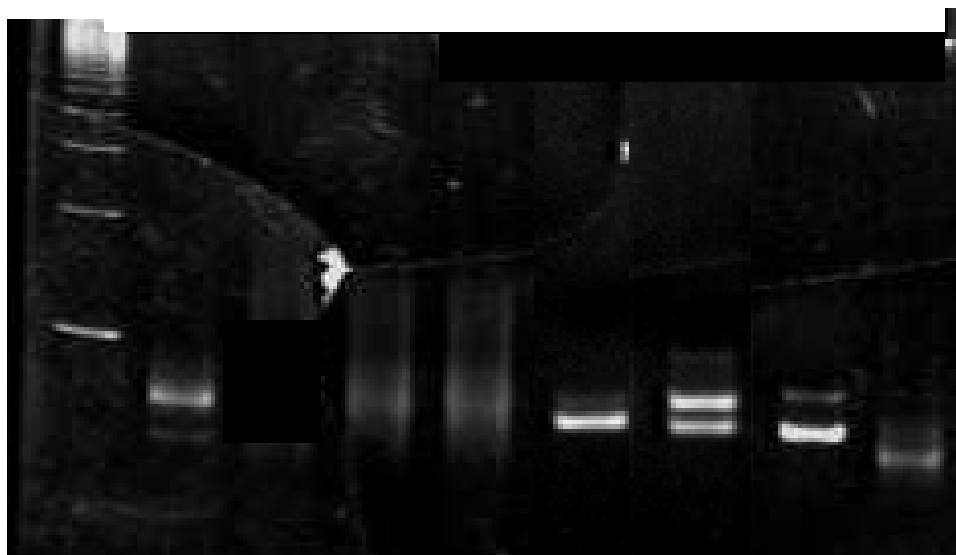


Figura 9: Gel de poliacrilamida 10% representando a análise do rearranjo dos genes que codificam para a cadeia γ do TCR. M: Marcador de pares de base (100 pb); 1 a 3: controles sadios, 4: controle positivo; 5 e 6: pacientes com diagnóstico clínico-patológico de ATL apresentando padrão monoclonal; 7: paciente de ATL com padrão misto de clonalidade das células leucêmicas.

Para avaliação do rearranjo dos genes que codificam para o TCR - β foi utilizado um protocolo descrito pelos mesmos autores. Foram analisadas oito amostras de DNA procedentes de doadores de banco de sangue nos quais observou-se tanto padrões monoclonais como policlonais. Também se avaliou DNAs procedentes da linhagem celular MT-2 e de pacientes de ATL com leucemia e foram observados padrões monoclonais, policlonais e mistos (Figura 10).

A obtenção de padrões tanto monoclonais como policlonais para os DNAs procedentes de doadores sadios tornou inviável a utilização deste protocolo para posterior análise dos pacientes com ATL.

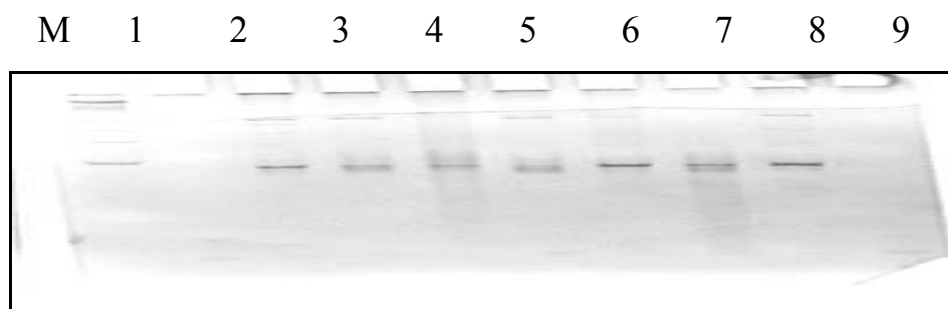


Figura 10: Gel de poliacrilamida 10% representando a análise do rearranjo dos genes que codificam para a cadeia β do TCR. M: marcador de pares de base (100 pb); 1 e 9: controles da reação; 2 a 8: controles sadios. Os produtos de PCR observados variam entre uma banda bem definida (2, 6 e 8), múltiplas bandas (3 e 5) e padrão misto (4 e 7).

5.2.2 Análise da clonalidade de células T em pacientes com ATL

Uma vez implementado, utilizou-se o protocolo descrito por Diss *et al.*(2005) para análise do rearranjo do gene da cadeia γ do TCR visando determinar o padrão clonal das células leucêmicas em pacientes de ATL. Foram analisados 36 pacientes com diagnóstico clínico-patológico de ATL, entre os quais dez apresentavam a forma clínica aguda, seis possuíam a forma linfoma, dois a forma tumoral, quatro estavam com a forma crônica e 14 com a forma indolente. A determinação do padrão clonal foi feito a partir de amostras de

DNA extraído do PBMC destes pacientes e em cinco deles utilizou-se também DNA extraído de tecidos de lesões de pele.

Os resultados encontrados estão resumidos na tabela 2. Em 26 dos 36 pacientes analisados, ou seja, em 72,2% dos casos foi observado padrão monoclonal, enquanto que em três das amostras analisadas (3,8%) o padrão encontrado foi policlonal. Em sete das 36 amostras analisadas (19,4%) observou-se a presença de uma banda predominante e múltiplas bandas menos intensas, o que foi considerado um padrão misto entre monoclonal e policlonal. O resultados obtidos na análise das lesões de pele coincidiram com o observado nas PBMCs correspondentes e, nestes casos, o padrão observado foi monoclonal (tabela 3).

Separando os pacientes por forma clínica, encontrou-se monoclonalidade de células T em todos os pacientes com a forma clínica aguda. O mesmo foi observado em quatro dos seis (66,7%) pacientes analisados da forma linfomatosa, em um dos dois pacientes (50%) da forma clínica tumoral primária de pele, em três dos cinco pacientes (60%) da forma crônica e em oito de 13 pacientes analisados (61,5%) de forma indolente. O padrão policlonal foi observado em três pacientes, das formas clínicas linfomatosa, crônica e indolente. O padrão misto foi observado em um paciente da forma linfomatosa, um da forma tumoral primária de pele, um da forma crônica e em quatro da forma indolente.

Tabela 2: Padrão de clonalidade de células T obtido a partir da análise dos DNAs extraídos do PBMC de pacientes de ATL com diferentes formas clínicas.

Forma clínica	Monoclonal	Policlonal	Misto	Total
Aguda	10	0	0	10
Linfoma	4	1	1	6
Tumoral primária	1	0	1	2
de pele				
Crônica	3	1	1	5
Indolente	8	1	4	13
Total	26	3	7	36

Tabela 3: Padrão de clonalidade de células T obtido a partir da análise dos DNAs extraídos de tecido de lesão de pele de pacientes de ATL.

Forma clínica	Monoclonal	Policlonal	Misto	Total
Linfoma	1	0	0	1
Tumoral	1	0	0	1
primária de pele				
Indolente	3	0	0	3
Total	5	0	0	5

5.3 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE CLONALIDADE OBTIDOS PELAS TÉCNICAS DE PCR INVERTIDO E ANÁLISE DO REARRANJO DOS GENES QUE CODIFICAM PARA A CADEIA γ DO TCR

Foram comparados os resultados referentes à clonalidade obtidos pela técnica de PCR invertido e pela técnica de análise de rearranjo dos genes que codificam para a cadeia γ do TCR. Observou-se integração monoclonal do DNA proviral, com a presença de uma única banda gerada pelo PCR invertido, em todos os pacientes em que as células T apresentaram padrão monoclonal mediante análise do rearranjo dos genes que codificam para o TCR- γ . Em um caso, não houve DNA suficiente para determinação da clonalidades das células leucêmicas. Em outros dois pacientes, apesar de haver integração monoclonal do provírus do HTLV-I no genoma do hospedeiro, de acordo com a PCR invertida, o padrão de clonalidade das células T foi misto (Tabela 3).

Quatro dos sete pacientes cujas amostras deram bandas não informativas através da técnica da PCR invertida mostraram um padrão misto na análise do rearranjo dos genes da cadeia γ do TCR. Destes, três apresentaram forma clínica indolente e um crônica. Um outro paciente, de forma clínica linfomatosa, mostrou padrão policlonal, enquanto os dois restantes, de forma clínica aguda e linfoma, mostraram padrão monoclonal.

Tabela 4: Padrão clonal determinado através das técnicas de análise dos sítios de integração proviral e do rearranjo dos genes que codificam para a cadeia γ do TCR.

Paciente	Integração proviral	Análise do rearranjo do TCR	Forma clínica
1	Monoclonal	Monoclonal	Aguda
2	Monoclonal	Monoclonal	Aguda
3	Monoclonal	Monoclonal	Aguda
4	Monoclonal	Monoclonal	Aguda
5	Monoclonal	Monoclonal	Linfoma
6	Monoclonal	Monoclonal	Linfoma
6 (Tecido)	Monoclonal	Monoclonal	Linfoma
7	Monoclonal	Monoclonal	Crônica
8	Monoclonal	Monoclonal	Crônica
9	Monoclonal	Monoclonal	Indolente
10	Monoclonal	Monoclonal	Indolente
10 (Tecido)	Monoclonal	Monoclonal	Indolente
11	Monoclonal	Misto	Indolente
12	Monoclonal	Monoclonal	Indolente
13	Monoclonal	-	Indolente
14	Monoclonal	Monoclonal	Indolente
15 (Tecido)	Monoclonal	Monoclonal	Indolente
16 (Tecido)	Monoclonal	Monoclonal	Indolente
17	Monoclonal	Misto	Tumoral primária de pele

6. DISCUSSÃO

Este estudo visou pesquisar o padrão de expansão monoclonal das células infectadas na ATL e a relevância das seqüências humanas interrompidas pelo DNA proviral do HTLV-I pois acredita-se que a integração proviral pode ser importante para o desenvolvimento da ATL. Assim, foi investigado se o DNA proviral integra-se em regiões codificantes ou

importantes para a expressão gênica podendo contribuir para o processo de transformação neoplásica da célula.

A população incluída no estudo, quando comparada com a coorte de 70 casos de ATL da Bahia, publicada por Bittencourt *et al.* (2007), apresentou proporção semelhante de pacientes com a forma clínica aguda (27,7% no presente estudo e 27,1% na coorte citada), com a forma tumoral primária de pele (13,9% e 14,3%, respectivamente) e de pacientes da forma crônica (5,5% e 7,1%). As demais formas clínicas tiveram proporção um pouco diversa: 16,7% no trabalho aqui descrito e 24,3% no estudo de Bittencourt *et al.* (2007) no subtipo linfomatoso e 36,1% e 27,1%, respectivamente, no subtipo indolente. Poucas amostras retrospectivas puderam ser utilizadas e os pacientes foram incluídos prospectivamente, o que provocou estas pequenas diferenças.

Obteve-se uma alta percentagem de amostras apresentando integração monoclonal do provírus. Este resultado está de acordo com os estudos de integração viral na ATL oriundos do Japão (Doi *et al.*, 2005; Hanai *et al.*, 2004; Takemoto *et al.*, 1994). Uma vez que a integração monoclonal é considerada fundamental para o diagnóstico conclusivo da ATL, este resultado também permitiu confirmar o diagnóstico de ATL realizado previamente por critérios clínicos, morfológicos e laboratoriais. Observou-se maior facilidade na realização da técnica de PCR invertida em amostras de pacientes com forma clínica aguda, uma vez que possuem grande número de células tumorais nas PBMCs. As amostras procedentes de pacientes com forma clínica indolente apresentaram mais dificuldade técnica devido a menor percentagem de células tumorais circulantes. No entanto, a PCR invertida mostrou sensibilidade suficiente para a análise destas amostras e para a análise de amostras procedentes de tecido fresco de lesão de pele neoplásica. A qualidade do DNA é limitante para obtenção de resultados informativos através da técnica de PCR invertida (IPCR e ILPCR). As amostras de DNA que não apresentaram bandas informativas quanto a determinação da integração proviral do HTLV-I, não possuíam DNA de boa qualidade pois foram extraídas a pelo menos sete anos, o que pode ter prejudicado os resultados. A obtenção de bandas não informativas como resultado da PCR invertida (bandas contendo somente seqüências virais ou humanas) mostra a importância do seqüenciamento após a amplificação. Alguns autores consideram a obtenção de uma única banda, sem posterior seqüenciamento, como padrão de integração monoclonal (Pombo de Oliveira *et al.*, 2001). No entanto, esse tipo de análise pode incluir resultados falso-positivos. A exigência de seqüências genômicas flanqueadas por seqüências virais valida os resultados encontrados, assegurando que as regiões encontradas são realmente sítios de integração proviral.

As amostras avaliadas mostraram expansão monoclonal de linfócitos T, principais alvos de infecção do HTLV-I (Yasunaga *et al.*, 2001). A maior parte dos pacientes que apresentou padrão misto era da forma clínica indolente. Nesta condição, um clone começa a destacar-se, porém, ainda existem outros clones em percentagens detectáveis. Os casos de padrão policlonal na forma crônica e linfoma corresponderam a amostras que apresentaram bandas não informativas para a técnica de PCR invertida. A qualidade do DNA também pode ter afetado os resultados, principalmente na análise de amostras de DNA extraídas há alguns anos e que não foram conservadas nas condições adequadas.

Faz-se necessário discutir certas limitações das técnicas aqui utilizadas. A técnica da PCR invertida baseia-se na amplificação de fragmentos de DNA pela enzima polimerase. Portanto, a obtenção de resultados pode ser influenciada pelas condições da amplificação e pelo tamanho do fragmento a ser amplificado, uma vez que não é capaz de amplificar grandes fragmentos de DNA (acima de 4 kb). Além disso, tal técnica não funciona em casos de provírus defectivos, isto é, quando o provírus possui apenas uma região LTR (Etoh *et al.*, 1997). A técnica de *Southern Blot* é uma alternativa à PCR invertida e pode proporcionar resultados mais precisos quanto ao padrão clonal das células infectadas. Porém, necessita de grande quantidade de DNA de boa qualidade, o que na maior parte dos casos a inviabiliza, além de ser menos sensível (Takemoto *et al.*, 1994). A principal limitação no uso da técnica de PCR para análise do rearranjo do TCR para determinação do padrão de clonalidade é o risco de resultados falso-positivos uma vez que, em portadores de HTLV-I pode haver proliferação de linfócitos T como resposta do sistema imune para eliminar células que expressam proteínas virais (Sales *et al.*, 2000). A PCR invertida, no entanto, consegue amplificar o clone majoritário proporcionando, após o seqüenciamento, a informação necessária para o diagnóstico conclusivo de ATL. Os resultados encontrados no presente trabalho mostram que, analisando em paralelo o rearranjo dos genes que codificam para o TCR e a PCR invertida, pode-se obter uma informação conclusiva sobre a clonalidade de linfócitos T infectados.

Neste trabalho optou-se por utilizar a análise do rearranjo dos genes que codificam para a cadeia γ do TCR. Na literatura, discute-se a utilização de protocolos que analisem os rearranjos da cadeia β ou γ para estudos de clonalidade de linfócitos T em leucemias e linfomas T. Diss *et al.* (1995) mostraram que, para demonstração do padrão clonal, a análise do rearranjo da cadeia γ é mais sensível que a análise da cadeia β (78% e 44%, respectivamente). Assaf *et al.* (2000), por sua vez, discutem a falha desta estratégia em cerca de 20% dos casos de linfoma devido a ausência de rearranjos dos genes para o TCR- γ . Outra

limitação da análise da clonalidade das células leucêmicas através da técnica de PCR para os genes que codificam para o TCR- γ é que sua limitada diversidade genética dificulta a distinção entre padrões clonais e policlonais (van Dongen *et al.*, 2003).

No entanto, Sales *et al.* (2005) têm demonstraram que a amplificação de segmentos do TCR- β permite a detecção de pequenas populações de células T clonais em portadores assintomáticos de HTLV-I, podendo ser utilizado no acompanhamento destes pacientes e na detecção de fases pré-leucêmicas. O grande repertório de rearranjos gênicos do TCR- β permite ainda identificar células tumorais residuais (van Dongen *et al.*, 2003). Durante a realização deste trabalho tentou-se, sem êxito, a otimização de protocolos para análise do rearranjo dos genes que codificam para a cadeia β do TCR. As técnicas empregadas resultaram em padrão monoclonal para todas as amostras testadas, sem distinção entre controles sadios e pacientes de ATL. Trabalhos na literatura ressaltam a dificuldade desta análise (Assaf *et al.*, 2000). O padrão monoclonal observado pode ser explicado por falha dos *primers* utilizados em identificar populações de células T com rearranjos diferentes da cadeia β do TCR, assim, apenas uma população celular é identificada. Estão sendo otimizados para esta análise protocolos validados pelo European BIOMED-2 collaborative Group, formado por 47 institutos procedentes de sete países europeus que, desde 2003 avaliam e padronizam um conjunto de protocolos estandardizados de análise de clonalidade de linfócitos T e B para fins diagnósticos (van Dongen *et al.*, 2003; Brüggemann *et al.*, 2007).

No presente trabalho, três sítios de integração proviral (17,6%) interromperam regiões codificantes. Esta percentagem é baixa comparando-se com os estudos oriundos do Japão. Hanai *et al.* (2004), ao analisarem 23 pacientes de ATL, encontraram 52% dos sítios de integração do provírus do HTLV-I interrompendo genes, muitos dos quais estão relacionados com processos oncogênicos. Ozawa *et al.* (2004) também observaram o DNA do provírus integrado em unidades transcricionais em pacientes com ATL. Em seu trabalho, 59,5% dos pacientes de ATL analisados apresentaram sítios de integração proviral em unidades transcricionais e, ao analisarem nove genes interrompidos por seqüências provirais, observaram aumento significativo da expressão de dois genes mediados pela integração do provírus do HTLV-I, demonstrando que o DNA proviral pode influenciar a expressão gênica. Doi *et al.* (2005), por sua vez, analisaram 59 pacientes de ATL e observaram que o DNA proviral integrou-se em sítios de transcrição em 33,9% dos casos, o que é equivalente à freqüência encontrada em integrações randômicas (33,2%).

Os genes interrompidos por seqüências virais encontrados no trabalho aqui exposto foram o *GLIS3*, *OCIAD2* e *c6orf210*. *GLIS3* é um fator de transcrição que pode funcionar

como ativador ou repressor de transcrição, expresso em diferentes tipos celulares. O padrão de expressão da proteína GLIS3 observado durante o desenvolvimento embrionário sugere que esta possui um importante papel na regulação dos processos celulares que ocorrem nesse período (Kim *et al.*, 2003). Outros genes da família *GLI* estão envolvidos na diferenciação tecido-específica e no surgimento de neoplasias (Ruppert *et al.*, 1988). O gene *OCIAD2* é expresso de forma significativa em casos de adenocarcinoma pulmonar invasivo ou não-invasivo e está associado a um melhor prognóstico dos pacientes (Ishiyama *et al.*, 2007). O gene *c6orf210*, também encontrado em um paciente analisado, codifica uma proteína que possui localização mitocondrial (Calvo *et al.*, 2006) e está entre os 20 genes mais expressos em tumores mamários negativos para o receptor de estrógeno (Yu *et al.*, 2007).

A maioria dos sítios de integração encontrados no trabalho aqui descrito (47%) estavam localizados em regiões repetitivas alfaídes. Tais regiões estão presentes em todos os cromossomos e existem somente nos centrômeros, os quais são fundamentais para que uma cópia de cada cromossomo duplicado e condensado seja levada para a célula-filha no momento da divisão celular. Proteínas dos centrômeros ligam-se às regiões de seqüências alfaídes, formando o cinetócoro, onde os microtúbulos do fuso mitótico prendem-se no momento da divisão celular (Alberts *et al.*, 2006). Doi *et al.* (2005) encontraram provírus integrado em seqüências repetitivas em 3,4% dos pacientes de ATL analisados. Em contrapartida, ao analisar portadores assintomáticos, observaram que 20% dos sítios de integração proviral interrompiam seqüências repetitivas alfaídes. No presente estudo, pacientes com forma aguda e com curta duração da doença (menos de 6 meses) apresentaram integração em regiões alfaídes. A interrupção de seqüências alfaídes presentes nos centrômeros poderia favorecer a aparição de anomalias cromossômicas favorecendo a transformação neoplásica da célula infectada. É necessário avaliar a estabilidade cromossômica e a presença de aberrações cromossômicas nos pacientes aqui estudados para pesquisar o possível impacto da integração em regiões alfaídes na ocorrência de aneuploidia. Na ATL, este tipo de alterações é freqüente, especialmente, em pacientes da forma clínica aguda e linfoma (Afonso *et al.*, 2007). Por outro lado, quando o provírus do HIV-1 integra-se em tais regiões, estabelece-se um período de latência em que ocorre a diminuição da transcrição de genes virais, favorecendo ao escape do controle do sistema imune do hospedeiro (Jordan *et al.*, 2003).

Deve-se lembrar que os trabalhos aqui discutidos referem-se ao estudo de pacientes de ATL da população japonesa, a qual possui algumas diferenças em relação a população de pacientes de ATL da Bahia. No Japão, a ATL manifesta-se após cerca de 60 anos de infecção

pelo vírus HTLV-I, enquanto que em Salvador a doença ocorre com aproximadamente uma década de antecedência. Além disso, a forma clínica mais freqüente na população da Bahia é a forma indolente e no Japão, a forma aguda. A forma indolente apresenta ainda maior sobrevida na Bahia (Bittencourt *et al.*, 2007). Apesar das diferenças observadas entre os pacientes de ATL do Japão e do Brasil, especialmente os pacientes da Bahia, não se conhece a razão para tal distinção.

Para tornar os resultados mais representativos, será necessário avaliar um número maior de pacientes.

Em um paciente (número 16) o sítio de integração do DNA proviral ocorreu em uma região com seqüências dos cromossomos 5 e 8 o que pode indicar uma possível translocação de segmentos cromossômicos. A detecção de um lugar de integração diferente nas PBMCs e na lesão de pele para um mesmo paciente, como observado no paciente dez, representa a presença de clones diferentes. O fato de que o paciente apresentou mais de dez anos de doença e foi submetido a tratamento com quimioterapia e posteriormente com AZT associado a IFN- α poderia ter provocado a aparição de um segundo clone. Estes dois casos deverão ser analisados mais extensamente.

A realização deste trabalho permitiu a implementação de duas técnicas moleculares de grande importância para o Estado da Bahia, que apresenta uma taxa de infecção pelo HTLV-I de 1,8% (Dourado *et al.*, 2003). A detecção da integração monoclonal do DNA proviral do HTLV-I pela técnica da PCR invertida proporciona a maior prova da associação da infecção pelo HTLV-I com a leucemia/linfoma e permite, assim, o diagnóstico conclusivo de ATL. Além disso, poder diferenciar entre neoplasia associada a vírus e neoplasia causada por outro fator em um paciente infectado por HTLV-I é de grande importância, diante da endemicidade para esta infecção no Estado da Bahia. A ATL não responde bem a quimioterapia usada para o tratamento de outras leucemias, assim, a determinação desta associação vírus – neoplasia é muito importante para a orientação do tratamento e avaliação do prognóstico. No presente estudo, a técnica de PCR invertida foi pela primeira vez otimizada e aplicada com resultados satisfatórios em um centro de pesquisa da América Latina.

A análise do tipo de expansão clonal dos linfócitos pela técnica do rearranjo dos genes que codificam para o TCR, permite o diagnóstico diferencial entre lesão inflamatória e linfoma, associado ou não ao HTLV-I. Esta distinção, algumas vezes, não pode ser feita por análise morfológica ou por imunofenotipagem e é fundamental nos casos da forma clínica indolente da ATL, onde o diagnóstico baseia-se, principalmente, no estudo histopatológico das lesões de pele. Esta técnica será de grande importância ainda para detectar a evolução de

casos de DIH para ATL. Dessa forma, a técnica de análise da expansão clonal de linfócitos aqui descrita pode ser uma importante ferramenta no diagnóstico clínico-patológico de pacientes de ATL e de outras formas de linfomas T cutâneos.

7. CONCLUSÕES

- As técnicas de ILPCR e IPCR permitiram determinar o local de integração do provírus do HTLV-I, independentemente da forma clínica ATL.

-
- Na maioria dos casos em que observou-se integração monoclonal do provírus do HTLV-I identificou-se expansão monoclonal das células infectadas.
- A técnica de análise do rearranjo dos genes que codificam para a cadeia γ do TCR permitiu avaliar o padrão de clonalidade das células infectadas em pacientes de ATL com a forma clínica indolente, apesar do pequeno número de células infectadas circulantes.
- Os pacientes estudados com diagnóstico clínico-patológico de ATL apresentam integração monoclonal do DNA proviral do HTLV-I.
- Nos pacientes de ATL da Bahia, o DNA proviral do HTLV-I não se integra preferencialmente em regiões codificantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. *Imunologia celular e molecular*. 5a edição. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2005, 133-167.
- Afonso, P. V., Zamborlini, A., Said, A., Mahieux, R. Centrosome and retroviruses: The dangerous liaisons. **Retrovirology**, **4**: 27-40, 2007.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. *Biologia molecular da célula*. 4a edição. Porto Alegre: **Artmed**, 2006, 216-233.
- Assaf, C., Michael, H., Dippel, E., Goerdts, S., Muller, H., Anagnostopoulos, I., Orfanos, C. E., Stein, H. High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing. **Blood**, **96**: 640-646, 2000.
- Azran, I., Schavinsky-Khrapunsky, Y., Aboud, M. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. **Retrovirology**, **1**: 20-44, 2004.
- Barbosa, H. S., Bittencourt, A. L., Barreto de Araujo, I., Pereira Filho, C. S., Furlan, R., Pedrosa, C. Adult T-cell leukemia/lymphoma in northeastern Brazil: a clinical, histopathologic, and molecular study. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, **21**: 65-71, 1999.
- [Bazarbachi A, Ghez D, Lepelletier Y, Nasr R, El-Sabban ME, Hermine O](#). New therapeutic approaches for adult T-cell leukaemia. **Lancet Oncol.**, **5**: 664-72, 2004.
- Bittencourt, A. L. Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma (ATL) in Bahia, Brazil. **II Int. Symp. Oncovir.**, **9**: 437-438, 2005.
- Bittencourt, A. L., Barbosa, H. S., Requião, C., Silva, A. C., Vandamme, A., Weyenberg, J., Farre, L. An exceptional pediatric case of ATL with a mixed CD4+ and CD8+ phenotype and a particularly indolent course. **J. Clin. Onc.**, **25**: 2007, 2480-2486.
- Bittencourt, A. L., Oliveira, M. F. Dermatite infecciosa associada ao HTLV-I (DIH) infanto-juvenil e do adulto. **An. Bras. Dermatol.**, **13**: 365-370, 2005.
- Bittencourt, A. L., Dourado, I., Bastos-Filho P., Santos, M., Valadão, E., Alcantara, L. C., Galvão-Castro, B. Human T-cell lymphotropic virus type I infection among pregnant women in northeastern Brazil. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Human Retrovirol.**, **26**: 490-494, 2001.
- Blattner, W. A., Gallo, R. C. Epidemiology of HTLV-I and HTLV-II infection. *In* Adult T-cell leukemia. New York: **Oxford University Press**: 1994. 45-90.

- Brüggemann, M., White, H., Gaulard, P., Garcia-Sanz, R., Gameiro, P., Oeschger, S., Jasani, B., Ott, M., Delsol, G., Orfao, A., Tiemann, M., Herbst, H., Langerak, A. W., Spaargaren, M., Moreau, E., Groenen, P. J., Sambade, C., Foroni, L., Carter, G. I., Hummel, M., Bastard, C., Davi, F., Delfau-Larue, M. H., Kneba, M., van Dongen, J. J., Beldjord, K., Molina, T. J. Powerful strategy for polymerase chain reaction-based clonality assessment in T-cell malignancies Report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4 CT98-3936. *Leukemia*, 21: 215-221, 2007.
- Calvo, S., Jain, M., Xie, X., Seth, S.A., Chang, B., Goldberger, O. A., Spinazzola, A., Zeviani, M., Carr, S. A., Mootha, V. K. Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nature Genetics*, 38: 576-582, 2006.
- Catalan-Soares, B., Carneiro-Proietti, A. B. F., Proietti, F. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 21: 926-931, 2005.
- Carneiro-Proietti, A. B. F., Ribas, J. G. R., Catalan-Soares, B. C., Martins, M. L., Brito-Melo, G. E. A., Martins-Filho, O. A., Pinheiro, S. R., Araújo, A. Q., Galvão-Castro, B., Oliveira, M. S. P., Guedes, A. C., Proietti, F. A. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. *Soc. Bras. Med. Trop.*, 35: 499-508, 2002.
- Derse, D., Crise, B., Li, Y., Princler, G., Lum, N., Stewart, C., McGrath, C. F., Hughes, S. H., Munroe, D. J., Wu, X. Human T-cell leukemia virus type 1 integration sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses. *J. Virol.*, 81: 6731-6741, 2007.
- Doi, K., Wu, X., Taniguchi, Y., Yasunaga, J., Satou, Y., Okayama, A., Nosaka, K., Matsuoka, M. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type I provirus integration sites in leukemic versus carrier states. *Blood*, 106: 1048-1053, 2005.
- [Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, et al.](#) HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 34: 527-31, 2003.
- Etoh, K., Tamiya, S., Yamagushi, K., Okayama, K., Tsubouchi, H., Ideta, T., Mueller, N., Takatsouk, K., Matsuoka, M. Persistent clonal proliferation of human t-lymphotropic virus type i-infected cells *in vivo*. *Canc. Res.*, 57: 4862-4867, 1997.

- Farre, L., Bittencourt, A. L., Silva-Santos, G., Almeida, A., Silva, A.C., Decanine, D., Soares, G. M., Alcântara Jr, L.C., Van Doreen, S., Galvão-Castro, B., Vandamme, A. M., Van Weyenbergh, J. Faz-670 promoter polymorphism is associated to susceptibility, clinical presentation, and survival in adult T cell leukemia. **J. Leuk. Bio., 83**: 220-222, 2008.
- Hanai, S., Nitta, T., Shoda, M., Tanaka, M., Iso, N., Mizogushi, I., Yashiki, S., Sonoda, S., Hasegawa, Y., Nagasawa, T., Miwa, M. Integration of human T-cell leukemia virus type 1 in genes of leukemia cells of patients with adult T-cell leukemia. **Cancer Sci., 95**: 306-310, 2004.
- Hermine O, Allard I, Levy V, Arnulf B, Gessain A, Bazarbachi A. A prospective phase II clinical trial with the use of zidovudine and interferon-alpha in the acute and lymphoma forms of adult T-cell leukemia/lymphoma. **Hematol. J., 3**: 276-282, 2002.
- Igakura, T., Stinchcombe, J. C., Goon, P. K., Taylor, G. P., Weber, J. N., Griffiths, G. M, Tanaka, Y., Osame, M., Bangham, C. R. Spread of HTLV-1 between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. **Science, 299**: 1713–1716, 2003.
- Ishiyama, T., Kano, J., Anami, Y., Onuki, T., Iijima, T., Morisita, Y., Yokota, J., Noguchi, M. OCIA domain containing 2 is highly expressed in adenocarcinoma mixed subtype with bronchioloalveolar carcinoma component and is associated with better prognosis. **Cancer Sci., 98**: 50-7, 2007.
- Johno, M., Oishi, M., Kojo, Y., Yamamoto, S., Ono, T. Cutaneous manifestations of adult T-cell leukemia/lymphoma. **Jap. Sci. Soc. Press, 20**: 33-42, 1992.
- Jordan, A., Bisgrove, D., Verdin, E. HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. **EMBO J., 22**: 1868-1877, 2003.
- Karube, K., Ohshima, K., Tsuchiya, T., Yamaguchi, T., Kawano, R., Suzumiya, J., Utsunomiya, A., Harada, M., Kikuchi, M. Expression of FoxP3, a key molecule in CD4CD25 regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells. **Br. J. Haematol. 126**: 81–84, 2004.
- Kamihira, S., Sugarara, K., Tsuruda, K., Minami, S., Uemura, A., Akamatsu, N., Nagai, H., Murata, K., Hasegawa, H., Hirakata, Y., Takasaki, Y., Tsukasaki, K., Yamada, Y. Proviral status of HTLV-1 integrated into the host genomic DNA of adult T-cell leukemia cells. **Clin. Lab. Haem., 27**: 235-241, 2005.
- Kim, Y., Nakanishi, G., Lewandoski, M., Jetten, A. M. GLIS3, a novel member of the GLIS subfamily of Krüppel-like zinc finger proteins with repressor and activation functions. **Nucl. Ac. Res., 31**: 5513-5525, 2003.

- Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J., Iwamasa, T., Goto, I., Yamamoto, N. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. **Virology**, **196**: 25-33, 1993.
- Kranz, D. M., Saito, H., Heller, M. Limited diversity of the rearranged T-cell gamma chain. **Nature**, **313**: 752, 1985.
- LaGrenade, L., Hanchard, B., Fletcher, V., Cranston, B., Blattner, W. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **Lancet**, **336**: 1345-7, 1990.
- Lazo, P. A., Lee, J. S., Tschlis, P. N. Long-distance activation of the Myc protooncogene by provirus insertion in Mlv-1 or Mlvi-4 in rat T-cell lymphomas. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**: 170-173, 1990.
- Macchi, B., Balestrieri, E., Mastino, A. Effects of nucleoside-based antiretroviral chemotherapy on human T cell leukaemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I) infection *in vitro*. **J. Antim. Chem.**, **51**: 1327-1330, 2003.
- Manel, N., Kim, F. J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M., Battini, J. L. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. **Cell**, **115**: 449-459, 2003.
- Matsuoka, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology**, **2**: 27-40, 2005.
- Matsuoka, M., Jeang, K. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature**, **7**: 270-280, 2007.
- Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de DST e Aids. Guia do manejo clínico do paciente com HTLV. Série A. Normas e Manuais Técnicos, n.º 58. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2004, 1-54.
- Mota, A. C., Van Doreen, S., Fernandes, F. M., Pereira, S. A., Queiroz, A. T., Gallazzi, V. O., Vandame, A. M., Galvão-Castro, B., Alcântara, L. C. The close relationship between South African and Latin American HTLV type 1 strains corroborated in a molecular epidemiological study of the HTLV type 1 isolates from a blood donor cohort. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, **23**: 503-507, 2007.
- Okayama, A., Stuver, S., Matsuoka, M., Ishizaki, J., Tanaka, G., Kubuki, Y., Mueller, N., Hsieh, C. C., Tachibana, N., Tsubouchi, H. Role of HTLV-1 proviral DNA load and clonality in the development of adult T-cell leukemia/lymphoma in asymptomatic carriers. **Int. J. Cancer.**, **110**: 621-625, 2004.

- Osame, M., Igata, A., Matsumoto, M. HTLV-I-Associated Myelopathy (HAM) treatment Trials, Retrospective Survey and Clinical and Laboratory Findings. **Hematol. Rev.**, **3**: 271-84, 1990.
- Ozawa, T., Itoyama, T., Sadamore, N., Yamada, Y., Hata, T., Tomonaga, M., Isobe, M. Rapid isolation of viral integration site reveals frequent integration of HTLV-1 into expressed loci. **J. Hum. Genet.**, **49**: 154–165, 2004.
- Poiesz, B., Ruscetti, F. W. , Gazdart, A. F., Bunnt, P. A., Minnat, J. D., Gallo, R. C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **77**: 7415-7419, 1980.
- Pombo de Oliveira, M. S., Matutes, E., Schulz, T., Carvalho, S. M., Noronha, H., Reaves, J. D., Loureiro, P., Machado, C., Catovsky, D. T-cell malignancies in Brazil. Clinico-pathological and molecular studies of HTLV-I positive and negative cases. **Int. J. Canc.**, **60**: 823-827, 1995.
- Pombo-de-Oliveira, M. S., Carvalho, S. M., Borducchi, D., Dobbin, J., Salvador, J., Correa, R. B., Moellman, A., Loureiro, P., Chiattonne, C., Rios, M. Adult T-cell leukemia/lymphoma and cluster of HTLV-I associated diseases in Brazilian settings. **Leuk. Lymphoma**, **42**: 135-44, 2001.
- Ruppert, J. M., Kinzler, K. W., Wong, A. J., Bingner, S. H., Kao, F. T., Law, F. T., Seuanez, H. N., O'Brien, S. J., Vogelstein, B. The GLI-Kruppel family of human genes. **Mol. Cell. Biol.**, **8**: 3104-3113, 1988.
- Sales, M. M., Bezerra, C. N. A., Hiraki, Y., Melo, N. B., Rebouças, N. A. Clonally rearranged T-cell receptor β chain genes in HTLV-I carriers with abnormal, non-flower-like, lymphocytes. **Eur. J. Haematol.**, **75**: 280-287, 2000.
- Sales, M. M., Bezerra, C. N. A., Hiraki, Y., Melo, N. B., Rebouças, N. A. Identification of clonally rearranged T-cell receptor beta chain genes in HTLV-I carriers as a potencial instrument for early detection of neoplasia. **Braz. J. Med. Bio. Reas.**, **38**: 695-704, 2005.
- Romanos, M. T. V., Santos, N. S. O., Miranda, M. M. F. S. Viroses oncogências. *In* Introdução à virologia humana. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2000, 199-204.
- Satou, Y., Yasunaga, J., Yoshida, M., Matsuoka, M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **103**: 720–725, 2006.

- Schroder, A. R., Shinn, P. Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., Bushman, F. HIV-1 integrations in the human genome favors active genes and local hotspots. **Cell**, **110**: 521-529, 2002.
- Senée, V., Chelara, C., Duchatelet, S., Feng, D., Blanc, H., Cossec, J. C., Charon, C., Nicolino, M., Boileau, P., Cavener, D. R., Bougnères, P., Taha, D., Julier, C. Mutations in *GLIS3* are responsible for a rare syndrome with neonatal diabetes mellitus and congenital hypothyroidism. **Nature Genetics** **38**: 682 – 687, 2006.
- Shera, K. A., Shera, C. A. McDougall, J. K. Small tumor virus are integrated near nuclear matrix attachment regions in transformed cells. **J. Virol.**, **75**: 12339-12346, 2001.
- Shimoyama M et al. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. **Br. J. Hematol.**, **79**: 428-437, 1991.
- Seiki, M., Eddy, R., Shows, T. B., Yoshida, M. Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. **Nature**, **309**: 640-642, 1984.
- Soares, B. C. C., Castro, M. S. M., Proietti, F. A. Epidemiologia do HTLV-I/II. *In* HTLV-I/II: Cadernos hemominas, Vol. XI. BeloHorizonte: **Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais**: 2000, 53-75.
- Takatsuki, K. Discovery of adult T-cell leukemia. **Retrovirology**, **2**:16-18, 2005.
- Tsukasaki, K., Miller, C. W., Kubota, T. Tumor necrosis factor alpha polymorphism associated with increased susceptibility to development of adult T-cell leukemia/lymphoma in human T-lymphotropic virus type 1 carriers. **Cancer Res.**, **61**: 3770-3774, 2001.
- Takatsuki, K., Uchiyama, T., Sagawa, K., Yodoi, J. Adult T cell leukemia in Japan. *In* Topics in Hematology. **Excerpta Medica**, 73-79, 1997.
- Takemoto, S., Matsuoka, M. Yamagushi, K., Takatsuki, K. A novel diagnostic method of adult T-cell leukemia: monoclonal integration of human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA detected by inverse polymerase chain reaction. **Blood**, **84**: 3080-3085, 1994.
- Takenouchi, N., Jones, K. S., Lisinski, I., Fugo, K., Yao, K., Cushman, S. W., Ruscetti, F. W., Jacobson, S. GLUT1 is not the primary binding receptor but is associated with cell-to-cell transmission of human t-cell leukemia virus type 1. **J. Virol.** **81**: 1506–1510, 2007.
- Taylor, G. P., Matsuoka, M. Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. **Oncogene**, **24**: 6047–6057, 2005.

- Urnovitz, H. B., Murphy, W. H. Human Endogenous Retroviruses: Nature, Occurrence, and Clinical Implications in Human Disease. **Clin. Micr. Rev.**, **9**: 72–99, 1996.
- Van Dongen, J. J. M., Langerak, A. W., Brüggemann, M., Evans, P. A. S., Hummel, M., Lavender, F. L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., Garcia-Sanz, R., van Krieken, J. H. J. M., Droese, J., Gonzalez, D., Bastard, C., White, H. E., Spaargaren, M., Gonzalez, M., Parreira, A., Smith, J. L., Morgan, G. J., Kneba, M., Macintyre, E. A. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOME-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. **Leukemia**, **17**: 2257-2317, 2003.
- Yamanaka, K., Kubo, K., Kiyoi, H., Ichihashi, T., Kato, K., Horibe, K., Naoe, T. Unusual feature of the T-cell receptor genes in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia Research**, **21**: 667-674, 1997.
- Yasunaga, J., Matsuoka, M. Human T-Cell Leukemia Virus Type I Induces Adult T-Cell Leukemia: From Clinical Aspects to Molecular Mechanisms. **Cancer Control**, **14**: 133-140, 2007.
- Yasunaga, J., Sakai, T., Nosaka, K., Etoh, K., Tamiya, S., Koga, S., Mita, S., Uchino, M., Mitsuya, H., Matsuoka, M. Impaired production of naive T lymphocytes in human T-cell leukemia virus type I-infected individuals: its implications in the immunodeficient state. **Blood**, **97**: 3177-3183, 2001.
- Yu, J. X., Sieuwerts, A. M., Zhang, Y., Martens, J. M., Smid, M., Klijn, J. G. M., Wang, Y., Foekens, J. A. Pathway analysis of gene signatures predicting metastasis of node-negative primary breast cancer. **BMC Cancer**, **7**:182-196, 2007.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B., Burgess, S. M. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. **Science**, **300**: 1749-1751, 2003.

ANEXOS

ANEXO A: Termo de consentimento livre e esclarecido

**TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO NO PROJETO SOBRE
LINFOMAS E HTLV-I NA CIDADE DE SALVADOR**

Nome: _____

End.: _____

Tel: _____

Eu, portadora de linfoma e do vírus HTLV-I, consinto que sejam retirados 20 mL de sangue para separação de células e/ou biópsia de lesão de pele para verificar se há integração do vírus nos linfócitos de meu sangue e/ou nas células da biópsia.

As células serão guardadas a -70° C para que seja realizado, posteriormente, o teste de biologia molecular para ver se há integração viral o que poderá vir a ser útil para avaliação da evolução de minha doença e para o meu tratamento. Eu fui esclarecida sobre minha doença e sobre os meios de sua transmissão.

Eu, abaixo assinada, portadora do documento de identidade nº _____ estou ciente da minha participação neste projeto de pesquisa e de que a minha recusa nesta participação não implicará em nenhuma restrição em meu atendimento médico.

Este documento foi lido e explicado verbalmente em palavras simples para mim pelo médico que me assiste.

Salvador,

Data: _____ de _____ de _____

Assinatura: _____

ANEXO B: Artigos científicos publicados

