FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

FIOCRUZ

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Expressão dos genes virais *HBZ* e *tax* em pacientes com Dermatite infecciosa associada ao HTLV-I

EVERTON DA SILVA BATISTA

Salvador - Bahia – Brasil
2010

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

FIOCRUZ

Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

Expressão dos genes virais *HBZ* e *tax* em pacientes com Dermatite infecciosa associada ao HTLV-I

EVERTON DA SILVA BATISTA

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – CPqGM – FIOCRUZ/BA

Orientadora: Maria Lourdes Farré Vallve

Salvador - Bahia – Brasil
2010

EVERTON DA SILVA BATISTA

Expressão dos genes virais *HBZ* e *tax* em pacientes com Dermatite infecciosa associada ao HTLV-I

Aprovado em: _____/_____/_____

_____

Profº Drº. Edgar Marcelino de Carvalho Filho

_____

Profº Drº. Alan John Alexander McBride

_____

Profª Drª. Maria Lourdes Farré Vallve

Epígrafe

“O ser humano vivência a si mesmo, seus pensamentos como algo separado do resto do universo - numa espécie de ilusão de ótica de sua consciência. E essa ilusão é uma espécie de prisão que nos restringe a nossos desejos pessoais, conceitos e ao afeto por pessoas mais próximas. Nossa principal tarefa é a de nos livrarmos dessa prisão, ampliando o nosso círculo de compaixão, para que ele abranja todos os seres vivos e toda a natureza em sua beleza. Ninguém conseguirá alcançar completamente esse objetivo, mas lutar pela sua realização já é por si só parte de nossa liberação e o alicerce de nossa segurança interior.” (Albert Einstein)

Agradecimentos

Primeiramente à Deus, uma força maior e essencial.

À minha família, por todo o incentivo para sempre continuar estudando e trabalhando e por toda a formação que a mim foi proporcionada.

À TODOS os meus amigos.

À minha orientadora, Drª. Lourdes Farré, pela oportunidade de fazer um dos muitos trabalhos de extrema importância para a sociedade que ela faz. Pelos conselhos, diálogos e toda orientação.

Aos atuais colegas de grupo: Marcelo, Juliana, Isabela e Leandro. E aos antigos: Aline Clara, Rodrigo e Tatiana

À Kiyoshi Fukutani, pela grande ajuda com as reações de PCR em tempo real.

Aos colegas do LAPEX, e ao chefe do laboratório, Drº. Zilton Andrade.

Ao Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - CPqGM.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB, pelo incentivo através da bolsa de Mestrado.

Ao grupo de Manifestações infanto-juvenís da infecção pelo HTLV-I na Bahia em nome da Drª. Achiléa Bittencourt, que através dessa colaboração tem realizado estudos extremamente relevantes em pacientes com HTLV-I no estado da Bahia.

Aos membros da banca examinadora, Drº. Edgar Carvalho e o Drº. Alan McBride, pela disponibilidade para contribuir com o trabalho.

Índice de Figuras

Figura 1 - Dermatite infecciosa em uma criança de 2 anos infectada pelo HTLV-I. Lesões eczematosas observadas predominantemente no couro cabeludo e região auricular. 18

Figura 2 - Dermatite infecciosa em uma criança de 2 anos infectada pelo HTLV-I. Lesões eczematosas observadas nas articulações dos membros superiores. 18

Figura 3 - Função pleiotrópica da Tax. Quatro diferentes funções de Tax e seus alvos diretos e indiretos. 20

Figura 4 - Transcritos do gene HBZ: *HBZ non-spliced* (*HBZ*) e *spliced* (*HBZ-SI*). 22

Figura 5 - Modelo proposto para a participação dos genes *tax* e *HBZ* na patogênese da ATL. 23

Figura 6 - (A) Curva padrão otimizada para o gene *HBZ*, para o transcrito HBZ-SI. Os pontos da curva representam uma diluição seriada (10^9-10^1). (B) Gráfico referente à curva de dissociação. (C) Reta de regressão linear que permite o cálculo do coeficiente de correlação (R^2) e o *Slope* da curva. 35

Figura 7 – (A) Curva padrão otimizada para o gene *HBZ* para o transcrito *HBZ*. Os pontos da curva representam uma diluição seriada (10^9-10^1). (B) o gráfico referente à curva de dissociação. (C) Reta de regressão linear que permite o cálculo do coeficiente de correlação (R^2) e o *Slope* da curva. 36

Figura 8 - (A) Curva padrão otimizada para o gene HBZ para o transcrito *HBZ-SI*. Os pontos da curva representam uma diluição seriada (10^9-10^1). (B) Gráfico referente à curva de dissociação. (C) Reta de regressão linear que permite o cálculo do coeficiente de correlação (R^2) e o *Slope* da curva. 37

Figura 9 – (A) Curva padrão otimizada para o gene que codifica para a *β2-microglobulina.* Os pontos da curva representam uma diluição seriada (10^9-10^1). (B) Gráfico referente à curva de dissociação. (C) Reta de regressão linear que permite o cálculo do coeficiente de correlação (R^2) e o *Slope* da curva. 38

Figura 10 - Expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nos pacientes de DIH. Os níveis dos transcritos se expressam como copias de transcrito em 140 ng de RNA total.. (A) Valores não ajustados. (B) valores ajustados pela expressão da *β2-microglobulina*. 41

Figura 11 - Expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nos portadores assintomáticos. Os níveis dos transcritos se expressam como copias de transcrito em 140 ng de RNA total.. (A) Valores não ajustados. (B) valores ajustados pela expressão da *β2-microglobulina.* 43

Figura 12 - Comparação da expressão do gene HBZ(transcritos HBZ-SI e HBZ) e do gene *tax* nos portadores assintomáticos. Figuras (A), (C) e (E), valores não ajustados. Figuras (B), (D) e (F), valores ajustados pela expressão do gene que codifica para *β2-microglobulina*. 45

Figura 13 - Expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nos pacientes de DIH e nos portadores assintomáticos. Os níveis dos transcritos se expressam como cópias de transcrito em 140 ng de RNA total. 47

Figura 14 - Expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nos pacientes de DIH e nos portadores assintomáticos. Os níveis dos transcritos se expressam como cópias de transcrito em 140 ng de RNA total ajustados pela expressão do gene humano da *β2-microglobulina.* 48

Figura 15 - Comparação da expressão de HBZ-SI em valores não ajustados (A), e ajustados (B) no grupo de pacientes de DIH e no grupo de pacientes de DIH que apresentaram associação com HAM/TSP. 50

Figura 16 - Correlação da expressão de HBZ-SI(A), HBZ(B) e *tax*(C) com o tempo de doença. Valores ajustados pelos valores de expressão do gene que codifica para *β2-microglobulina* pela carga proviral, utilizando teste Spearman r, com r= 0,0163, para HBZ-SI, r= -0,04198 para HBZ e r= 0,08671 para *tax*. 51

Figura 17 - Correlação da expressão de HBZ-SI(A), HBZ(B) e *tax*(C) com a manifestação da doença. Valores ajustados pelos valores de expressão do gene que codifica para *β2-microglobulina* pela carga proviral. 52

Figura 18 - Correlação da expressão de HBZ-SI(A), HBZ(B) e *tax*(C) com a presença de linfócitos atípicos no sangue periférico. Valores normalizados pelos valores de expressão do gene que codifica para *β2-microglobulina* e normalizados pela carga proviral. LN: Grupo que apresenta linfócitos normais. CF: Grupo que apresenta célula-em-flor. 53

Figura 19 - Correlação da expressão de HBZ-SI(A), HBZ(B) e *tax*(C) com a presença de linfócitos atípicos no sangue periférico. Valores normalizados pelos valores de expressão do gene que codifica para *β2-microglobulina* e normalizados pela carga proviral. LN: Grupo que apresenta linfócitos normais. CF: Grupo que apresenta célula-em-flor. 54

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Características dos Pacientes com DIH estudados. 27

Tabela 2 - Características dos portadores assintomáticos do HTLV-I estudados. 28

Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores para obtenção do fragmento dos genes *tax*, *HBZ (HBZ E HBZ-SI)* e *β2-microglobulina*. 31

Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados para a técnica de PCR quantitativo em tempo real para os genes *tax*, *HBZ (*transcritos HBZ e HBZ-SI) e *β2-microglobulina*. 33

Tabela 5 - Oligonucleotídeos e sondas utilizados para a quantificação da carga proviral por PCR em tempo real. 34

Tabela 6 - Comparação da amplificação dos genes estudados no grupo de pacientes de DIH. 39

39

Tabela 7 - Comparação da amplificação dos genes estudados no grupo de portadores assintomáticos.

Lista de abreviaturas

HTLV-I (*Human T cell Lymphotropic Virus Type I*)	12
PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)	12
tRNA (*Transfer RNA*)	12
LTRs (*Long terminal repeats*)	12
HBZ (*HTLV-I bZIP factor*)	12
ATL (*Adult T-cell leukemia/lymphoma*)	13
HAM/TSP (*Human T-lymphotropic virus type-I-associated myelopathy / tropical spastic paraparesis*)	13
DIH (Dermatite infecciosa associada ao HTLV-I)	13
TNF-α (*Tumor necrosis factor-alpha*)	15
IFN-γ (*Interferon-gamma*)	15
kD (*kiloDalton*)	17
CTL (*Cytotoxic T Lymphocytes*)	21
HUPES (Hospital Universitário Professor Edgard Santos)	24
HIV (*Human immunodeficiency vírus*)	24
ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay)*	24
rpm (Rotação por minuto)	26
cDNA (Complementary DNA)	27
ng (N*anograms*)	27
MT-2(Linhagem celular com o genoma completo do HTLV-I)	27
Tris-HCl (*tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloric acid*)	28
KCl (*Potassium chloride*)	28
dNTP (*Deoxynucleotides triphosphate*)	28
$MgCl_2$ (*Magnesium Chloride*)	28
IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*)	29
X-Gal (*Bomo-chloro-indolyl-galactopyranoside*)	29
Ct (*Cycle Threshold*)	30
R^2 (Coeficiente de correlação)	30

Sumário

1. Introdução 14

1.1 HTLV-I 14

1.2 Doenças associadas ao HTLV-I 15

1.3 Patogênese do HTLV-I 19

1.4 O gene viral *tax* 19

1.5 O gene *HTLV-I bZIP factor* (*HBZ*) 21

2. Justificativa 24

3. Objetivo geral 25

3.1 Objetivos específicos 25

4. Metodologia 26

4.1 População estudada 26

4.2 Obtenção das amostras e extração de RNA e DNA 28

4.2.1 Obtenção do cDNA 29

4.3 Quantificação da expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* 29

4.3.1 Obtenção dos plasmídeos para a construção das curvas padrão 29

4.3.2 Obtenção das curvas padrão 32

4.3.3 Amplificação das amostras 33

4.4 Quantificação da carga proviral 33

4.5 Considerações éticas 34

4.6 Análise estatística 34

5. Resultados 35

5.1 Expressão dos genes *HBZ* (transcritos HBZ e HBZ-SI) e *tax* em portadores do HTLV-I na faixa infanto-juvenil 35

5.1.1 Construção das curvas padrão para quantificação dos genes estudados 35

5.1.2 Expressão dos genes *HBZ* (transcritos HBZ e HBZ-SI) e *tax* nos pacientes de DIH 39

5.1.3 Correlação entre os níveis de expressão dos genes virais *HBZ* e *tax* 43

5.2 Correlações entre a expressão dos genes virais *HBZ* e *tax* e a carga proviral 45
5.3 Relação entre a expressão dos genes virais *HBZ* e *tax* e os dados clínicos dos pacientes de DIH 47
5.3.1 Relação entre a expressão de *HBZ* e *tax* e o tempo de infecção. 47
5.3.2 Relação entre a manifestação de HAM/TSP nos pacientes de DIH e a expressão dos genes *HBZ* e *tax.* 47
5.3.3 Relação entre o tempo de doença e a expressão dos genes *HBZ* e *tax*. 50
5.3.4 Relação entre a manifestação da DIH e a expressão dos genes *HBZ* e *tax* 51
5.3.5 Relação entre a presença de linfócitos atípicos no sangue periférico e a expressão de *HBZ* e *tax* 52
6. Discussão 53
7. Conclusões 59
8. Referências 60

Resumo

O vírus linfotrópico de de células T humanas do tipo I (HTLV-I) está associado com diversas patologias como a Dermatite infecciosa associada ao HTLV-I (DIH) é um tipo de eczema infectado e recidivante que incide em crianças que adquirem verticalmente a infecção pelo HTLV-I, podendo evoluir para a Leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL), e a Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-I (HAM/TSP), caracterizadas por acometerem indivíduos infectados na idade adulta. O gene viral *tax*, codifica uma proteína de 40kD responsável pela ativação transcricional do 5´LTR do HTLV-I e considerada tradicionalmente a principal indutora das etapas iniciais da patogênese viral, pois é capaz de estimular a proliferação dos linfócitos infectados e inibir a apoptose, porém é o principal antígeno imunodominante, tornando-se alvo das células $TCD8^{+}$. O gene HTLV-I *basic leucine zipper* (*HBZ*) transcreve-se em sentido contrário ao outros genes virais, produzindo dois transcritos (HBZ-SI e HBZ), que são consistentemente encontrados em células ATL e alvo de diversos estudos atualmente, nos quais verificou-se que a proteína codificada por este gene tem participação da inibição da transativação mediada por Tax, e que o mRNA passa a mediar a proliferação dos linfócitos T infectados. Pela técnica de PCR em tempo real, verificou-se que em 32 pacientes de DIH e em 08 portadores assintomáticos de HTLV-I, houve a expressão de HBZ-SI, HBZ e *tax*, sendo que nos pacientes de DIH, HBZ-SI e HBZ apresentaram valores de expressão maiores que os valores de *tax* e que de forma inesperada, houve uma correlação positiva na expressão dos transcritos do gene *HBZ* com o gene *tax*, indicando que os pacientes que tem altos níveis de *HBZ* tem altos níveis de tax.

Abstract

The lymphotropic virus Human T cell type I (HTLV-I) is associated with various pathologies such as infectious dermatitis associated with HTLV-I (IDH) is a type of eczema and recurrent infection that affects children vertically infected HTLV-I and can progress to leukemia/lymphoma adult T cell (ATL) and tropical spastic paraparesis associated myelopathy HTLV-I (HAM/TSP) a characteristic that compromises infected individuals in adulthood. The *tax* viral gene, encodes a protein of 40kD responsible for transcriptional activation of the 5'LTR of HTLV-I and traditionally considered the main inducer of the early steps of viral pathogenesis, since it is able to stimulate the proliferation of infected lymphocytes and inhibit apoptosis, but is the major immunodominant antigen, becoming the target of $CD8^+$ T cells. The gene HTLV-I *basic leucine zipper* (*HBZ*) is transcribed in the opposite direction to the other viral genes, producing two transcripts (HBZ-SI and HBZ), which are consistently found in ATL cells and the target of several ongoing studies, in which there that the protein encoded by this gene participates in the inhibition of transactivation mediated by Tax and that the mRNA begins to mediate the proliferation of infected T lymphocytes. By PCR in real time, it was found that in 32 patients with IDH and 08 asymptomatic HTLV-I, there was expression of HBZ-SI, HBZ and *tax*, and in patients of IDH, HBZ-SI and HBZ showed expression values higher than those of *tax* and unexpectedly, there was a positive correlation in expression of gene transcripts *HBZ* with the *tax* gene, indicating that patients who have high levels of *HBZ* has high levels of *tax*.

1. Introdução

1.1 HTLV-I

O vírus linfotrópico para células T humano tipo I (HTLV-I) é um retrovírus que pertence ao gênero *Deltaretrovirus*, subfamília *Orthoretrovirinae* e foi descrito após ser isolado de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de um paciente com linfoma cutâneo. (Poiesz *et al*., 1980).

O HTLV-I é um retrovírus envelopado, que possui no interior do seu capsídeo duas cópias de RNA associadas a uma molécula de RNA transportador (tRNA) que atua como iniciador para a síntese de DNA proviral. Além disso, contém ainda as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (Romanos *et al.,* 2000). O genoma do vírus apresenta 9,03Kb e possui os genes *gag*, *pol*, *env* e a região *pX* que são flanqueados por duas sequências terminais repetitivas (*long terminal repeats* – LTRs). A região *pX* é característica do HTLV-1 e contém os genes que codificam para as proteínas virais Tax, rex, *HTLV-I bZIP factor* (*HBZ*), p12, p13, p30 e p21 que estão relacionadas com a patogênese viral (Matsuoka & Jeang, 2007).

Estima-se que no mundo cerca 15 a 20 milhões de pessoas sejam portadoras do HTLV-I. São consideradas áreas de alta endemicidade para esse retrovírus o sudoeste do Japão, a América do Sul, a África equatorial e algumas ilhas do Caribe (Jamaica e Trinidad-Tobago) (Catalan-Soares *et al*., 2001). Nas mulheres, a taxa de infecção foi estimada em 2% e nos homens em 1,2% (Catalan-Soares & Proietti *et al*, 2006). No Brasil, o número de indivíduos infectados pelo HTLV-I é de aproximadamente 2,5 milhões sendo detectadas as maiores prevalências de infecção em amostras de banco de sangue nos estados da Bahia e do Maranhão (Carneiro-Proietti *et al*., 1998; Catalan-Soares *et al.,* 2005). Na população geral de Salvador, foi observada uma taxa de infecção pelo HTLV-I de 1,74% (Dourado *et al*., 2003), que afeta principalmente a indivíduos afro-descendentes e de baixa renda.

A principal via de transmissão do HTLV-1 é de mãe para filho através da amamentação. A transmissão por via transplacentária também é possível. O HTLV-1 também pode ser transmitido por via horizontal, por contato sexual sem proteção com

um portador ou parenteral, por transfusão de sangue contaminado e através compartilhamento de material perfuro-cortante contaminado (Manns *et al*., 1999).

1.2 Doenças associadas ao HTLV-I

O HTLV-I está associado a diversas doenças dentre elas a leucemia/linfoma das células T do adulto – (ATL) (Shimoyama *et al*., 1991), a mielopatia associada ao HTLV-I/paraparesia espástica tropical – (HAM/TSP) (Osame *et al*., 1986) e dermatite infecciosa associada ao HTLV-I – (DIH) (La Grenade *et al*., 1990). É importante destacar que a maior parte dos portadores do HTLV-I permanecem assintomáticos (Soares *et al*., 2000) e que ainda não se conhecem os fatores que levam um portador assintomático manifestar doença (Jeffery *et al*., 1999). Na Bahia, observam-se todas estas patologias causadas pelo HTLV-I (Bittencourt *et al*., 2007; Oliveira *et al*., 2005; Primo *et al*., 2005).

A ATL é uma forma muito agressiva de neoplasia da célula T (geralmente CD4+) resistente à quimioterapia e geralmente fatal que ocorre predominantemente na idade adulta. A diversidade das manifestações clínicas da ATL determinou a subdivisão da doença em cinco subtipos clínicos – agudo, linfomatoso, crônico, indolente (smoldering) e tumoral primário de pele com características próprias (Shimoyama *et al*, 1991; Bittencourt *et al*., 2007). As formas, aguda, linfoma e tumoral primária de pele são mais agressivas e têm pior prognóstico. A ATL desenvolve-se em aproximadamente 2 – 5% dos pacientes infectados pelo HTLV-I, os quais se encontram na idade adulta com média de idade de 50 anos. (Arisawa *et al*., 2000). Os fatores que determinam o desenvolvimento dessa patologia nesta percentagem de portadores ainda são desconhecidos. Além disso, também não se conhecem os fatores que determinam a manifestação de uma ou outra forma clínica. Na Bahia, a ATL corresponde a 33% dos casos diagnosticados de linfomas T em geral e os pacientes adquirem o vírus principalmente por via vertical, através da amamentação. (Barbosa *et al*, 1997).

A HAM/TSP desenvolve-se em aproximadamente 4% das pessoas infectadas com o HTLV-I (Orland *et al*., 2003) e mais freqüente no gênero feminino. A media da idade de inicio da doença é de 46 anos (Moreno-Carvalho *et al*., 1992; Nakagawa, 1995). A HAM/TSP é uma doença inflamatória crônica na qual ocorrem lesões no

sistema nervoso central. O quadro clínico corresponde a paraparesia espástica crônica e progressiva, envolvendo principalmente o trato piramidal (reflexos exaltados nos membros inferiores, clônus e sinal de Babinski), com fraqueza proximal nos membros inferiores, bexiga neurogênica e lombalgia (Nakagawa, 1995). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o quadro clínico e a presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e no liquor são considerados critérios essenciais para o diagnóstico da HAM/TSP (Osame *et al*, 1986; Primo *et al.,* 2005). Estudos demonstraram a carga proviral do HTLV-I no sangue periférico em pacientes com HAM/TSP é significativamente maior que nos portadores assintomáticos (Kira *et al*., 1991).

A DIH foi descrita na Jamaica (Sweet *et al.*, 1966) e mais tarde associada ao HTLV-I (La Grenade *et al*, 1990). Ocorre geralmente na faixa infanto-juvenil, em crianças que adquirem o vírus principalmente por via vertical e com mais freqüência em portadores do sexo feminino (Bittencourt *et al.*, 2006, Oliveira *et al*., 2005). A probabilidade das crianças infectadas desenvolverem DIH aos 4 anos de idade é de 2 % (Maloney *et al*, 2000). Pode iniciar-se depois do décimo oitavo mês de vida e raramente persiste até a idade adulta (Gonçalves *et al*., 2000). Foi relatado apenas um caso de DIH onde ocorreu transmissão por transfusão de sangue e raros casos de DIH no adulto (Oliveira *et al*., 2005).

As maiores coortes de DIH tem sido reportadas na Jamaica e mais recentemente na Bahia (Oliveira *et al*., 2005). Uma pequena série de casos foi descrita em Trinidade e Tobago(Suíte *et al*., 1994), Peru (Aquije *et al*., 2002) e Senegal (Mahé *et al*., 2004). De maneira interessante, no Japão, onde a prevalência da infecção por HTLV-I é elevada, apenas dois casos de crianças com DIH foram descritos, ambos os casos evoluíram para a ATL na idade adulta (Tsukasaki *et al*, 1994).

A DIH é uma forma de eczema grave, infectado e recidivante. As lesões na DIH são eritematosas, escamosas e formam crostas. Envolvem o couro cabeludo e região auricular (Figura 1), articulações de membros superiores (figura 2), genitália, dentre outras partes do corpo. Os principais critérios para diagnóstico da DIH são: 1. Eczema do couro cabeludo, axilas, virilhas, pavilhão auricular, regiões retroauriculares, pálpebras, pele paranasal e/ou pescoço; 2. Rinorréia crônica e/ou lesões crostosas no vestíbulo nasal; 3. Dermatite crônica recidivante com resposta imediata à antibioticoterapia e com recidiva após suspensão do tratamento; 4. Início precoce na infância; 5. Soropositividade para o HTLV-1. Segundo esses autores, a inclusão dos

itens 1, 2 e 5 e o envolvimento de pelo menos duas regiões do corpo para preenchimento do critério 1 são obrigatórios (La Grenade *et al*, 1998). O desenvolvimento da DIH foi relacionado com infecção *por Staphylococcus aureus* e/ou *β-hemolyticus* (La Grenade *et al*, 1998)

Na Bahia, foi observado que aproximadamente 30% dos casos de DIH também manifestam a forma infanto-juvenil de HAM/TSP (Primo *et al*., 2005). A DIH e a ATL parecem estar relacionadas (Hanchard *et al*, 1991). Dados de nosso grupo mostram que 34% dos casos de ATL primariamente cutâneos têm história previa de DIH (Bittencourt *et al*, 2005). Na literatura foram descritos casos de DIH que evoluíram para ATL (Tsukasaki *et al*., 1994; Hanchard *et al*., 1991; La Grenade *et al*., 1995) e nosso grupo descreveu recentemente um caso de manifestação simultânea de ATL e HAM/TSP em uma adolescente com DIH (Farre *et al*., 2008). Estes dados sugerem que a DIH poderia representar um indicador prognóstico de condições patológicas associadas ao HTLV-I que possam vir à ocorrer em etapas mais tardias, como a ATL.

A patogênese da DIH é ainda desconhecida. Não se sabe por que apenas algumas crianças infectadas desenvolvem esta doença, a maioria permanecendo assintomática. Existe a possibilidade de que o desenvolvimento dessa dermatite esteja ligado a fatores genéticos e/ou relacionados com a interação do vírus com o portador (Proietti *et al*., 2005). Recentemente foi demonstrado que os pacientes com DIH apresentam uma resposta imune Tipo 1 exacerbada, com alta produção de TNF-α e IFN-γ no PBMC, muito semelhante à observada em pacientes adultos com HAM/TSP (Nascimento *et al*., 2009). Também apresentam uma carga proviral elevada quando comparados aos portadores assintomáticos adultos e similar aos pacientes adultos com HAM/TSP (Primo *et al*, 2009).

Figura 1: Dermatite infecciosa em uma criança de 2 anos infectada pelo HTLV-I. Lesões eczematosas observadas predominantemente no couro cabeludo e região auricular. Fonte : Bittencourt *et al.,* 2006

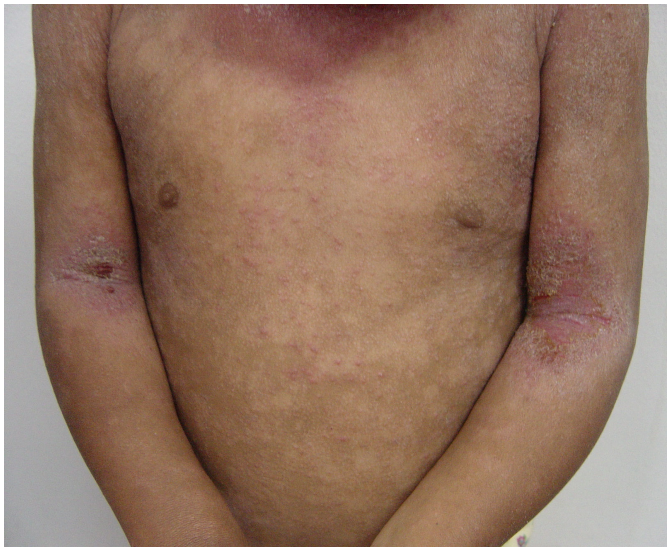

Figura 2 : Dermatite infecciosa em uma criança de 2 anos infectada pelo HTLV-I. Lesões eczematosas observadas nas articulações dos membros superiores.

1.3 Patogênese do HTLV-I

O HTLV-1 tem capacidade de infectar diversos tipos celulares incluindo linfócitos B, células dendríticas e monócitos (Taylor & Matsuoka, 2005), porém, apresenta tropismo preferencial por linfócitos T $CD4^+$ (Yoshida *et al.*, 1984). A propagação do vírus no indivíduo infectado ocorre principalmente através de duas vias: 1) por sinapses virológicas, onde acontece à transferência do material viral de uma célula infectada para a célula não infectada que se encontra em contato, sem a produção de partículas virais e 2) proliferação clonal dos linfócitos infectados, onde produtos dos genes virais estimulam a divisão da célula hospedeira (Bangham *et al.*, 2003). Estas duas vias visam aumentar o número de células infectadas. Nos portadores de HTLV-I são detectadas poucas partículas virais circulantes, e deste modo, o aumento do número de células infectadas é a principal forma de aumentar a carga proviral. A carga proviral pode avaliar-se pela quantificação do número de células infectadas, que contém uma única copia do DNA proviral inserido no DNA genômico humano.

Acredita-se que o vírus estimula a proliferação clonal dos linfócitos infectados através dos produtos de alguns genes virais que se encontram na região pX. Estes genes se expressam após a integração do DNA proviral no genoma da célula hospedeira. Dentre eles, os principais relacionados com a proliferação da célula hospedeira são o gene *tax,* (Matsuoka & Kuan-Teh Jeang, 2007) qual proteína foi apontada na literatura como tendo um papel essencial na patogenicidade do HTLV-I e o gene *HBZ,* que foi descrito há poucos anos e sua função vem sendo recentemente estudada.

Na literatura, existe a hipótese de que a DIH pode ser resultado da desregulação do sistema imune causada pela proliferação exacerbada dos linfócitos infectados.

1.4 O gene viral *tax*

O gene *tax* codifica uma proteína de 40 kD que é responsável pela ativação transcricional do 5'LTR do HTLV-I. A proteína Tax é considerada na literatura a principal indutora das etapas iniciais da patogênese viral, pois é capaz de estimular a proliferação e inibir a apoptose da célula infectada, induzindo instabilidade genética e regulando vias celulares-chave no controle desses processos, como a via de AKT, NF-kB e p53 (Matsuoka, 2005). Tax tem uma significante atividade mitogênica,

especialmente na transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Neuveut *et al*., 1998; Schmitt *et al*., 1998). Por outro lado, a proteína Tax e o principal antígeno imunodominante para as células T CD8+ específicas para o HTLV-1. Deste modo, a expressão do gene *tax* permite que o sistema imune reconheça e elimine a célula infectada. De maneira interessante, foi observado em trabalhos oriundos do Japão a expressão do gene *tax* em células procedentes de pacientes com ATL, HAM/TSP e de portadores assintomáticos adultos, e observou-se que a expressão deste gene é baixa ou inexistente (Matsuoka, 2005; Saito *et al*., 2009).

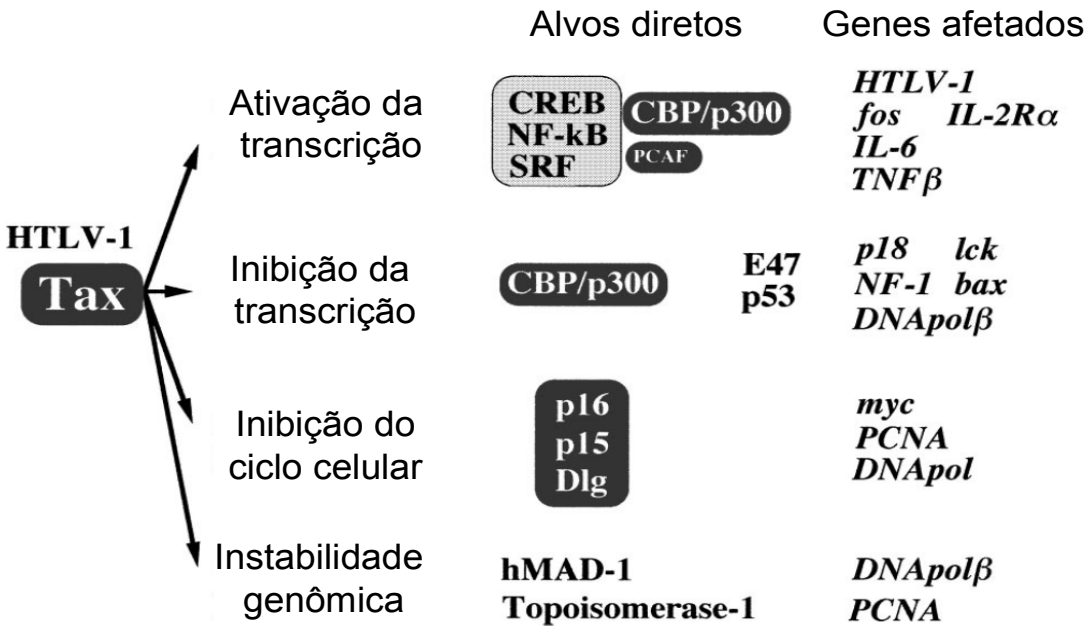

Figura 3: Função pleiotrópica da Tax. Quatro diferentes funções de Tax e seus alvos diretos e indiretos. Fonte: Yoshida, 2001

Estes dados provocaram uma nova revisão sobre o papel de Tax na patogênese do HTLV-1 (Saito *et al* 2009; Kamihira *et al*., 2008). Não existem dados na literatura sobre a expressão deste gene na DIH.

Três mecanismos foram identificados como responsáveis pela inativação da expressão de Tax: 1) mudanças genéticas no gene *tax* (mutações *nonsense*, deleções ou inserções); 2) metilação do DNA da região 5´-LTR; 3) deleção da região 5´- LTR

(Matsuoka, 2005; Kamihira *et al*., 2008). Estes eventos foram estudados apenas em pacientes com ATL e a frequência com que eles ocorrem é baixa, sugerindo que outros mecanismos estão implicados na inativação deste gene.

1.5 O gene *HTLV-I bZIP factor* (*HBZ*)

Recentemente, foi descrito o gene viral *HTLV-1 bZIP factor (HBZ*) (Gaudray *et al*., 2002), que se transcreve em sentido negativo (*antisense*) e é o único da região pX na qual o promotor encontra-se na região 3'LTR do provírus. (Figura 4). Foram descritas funções distintas para o RNA mensageiro e para a proteína deste gene.

Mostrou-se que o mRNA HBZ promove proliferação de linfócitos T *in vitro* e *in vivo* e que a inibição da transcrição do gene *HBZ,* por RNA de interferência (siRNA), diminui significantemente a proliferação de células ATL (Satou *et al*., 2006). O gene *HBZ* produz dois transcritos (Figura 4), sendo que um deles é fruto de *splicing* alternativo (*HBZ-SI* ou *sHBZ). HBZ-SI* é detectado mais freqüentemente nas células infectadas de pacientes com ATL e HAM/TSP e tem um papel mais importante na proliferação celular. (Murata *et al., 2006*).

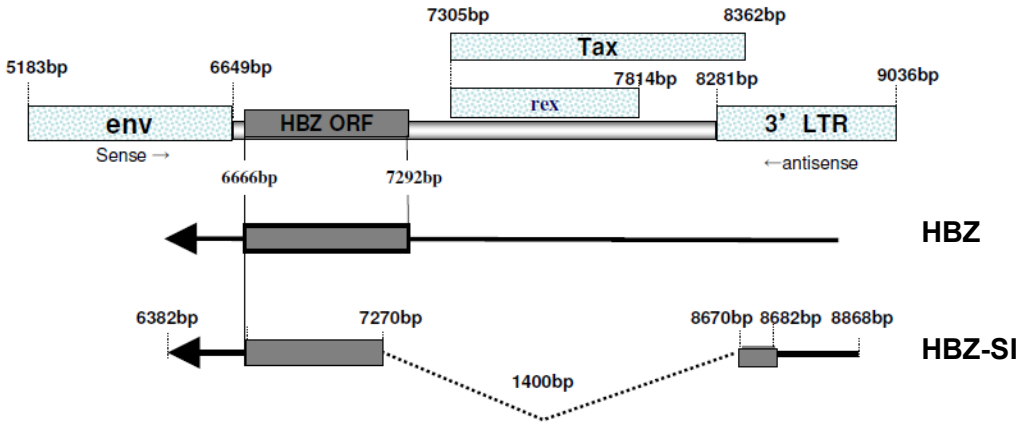

Figura 4: Transcritos do gene HBZ: *HBZ non-spliced* (*HBZ*) e *spliced* (*HBZ-SI*). Fonte: Kamihira S. *et al*, 2008.

Por outro lado, a proteína HBZ suprime a transativação viral mediada por Tax através do 5' LTR. Diferente da proteína Tax, a proteína *HBZ* localiza-se no núcleo da célula e não é alvo dos linfócitos T $CD8^{+,}$ deste modo, a expressão dessa proteína não compromete a sobrevida da célula infectada. (Gaudray *et al*., 2002; Hivin *et al*., 2005; Matsumoto *et al*., 2005; Thebault *et al*., 2004).

Recentes trabalhos mostram que o gene *HBZ* se expressa de maneira geral nas células infectadas de portadores assintomáticos, pacientes com HAM/TSP e ATL (Saito *et al*., 2009). Essa expressão de *HBZ* geralmente ocorre na ausência da expressão de *tax*..

Também foi observado na ATL que a região 3' LTR, onde localiza-se o promotor do gene *HBZ*, permanece intacta, enquanto que a 5' LTR, onde localiza-se o promotor do gene *tax*, é freqüentemente metilada ou deletada (Miyazaki *et al*., 2007). Deste modo, se sugere na literatura que a expressão do gene *tax* poderia ser importante nas fases iniciais após infecção e que posteriormente a sua expressão seria inibida dando lugar à expressão do gene *HBZ* (Figura 5), que o substituiria como responsável da continua proliferação das células infectadas (Satou *et al*., 2006). Porém, ainda não foi esclarecido como o balanço da expressão destes dois genes virais *tax* e *HBZ* influencia e/ou contribui no desenvolvimento e evolução das patologias relacionadas com o HTLV-I. Não existem dados na literatura sobre a expressão deste gene na DIH.

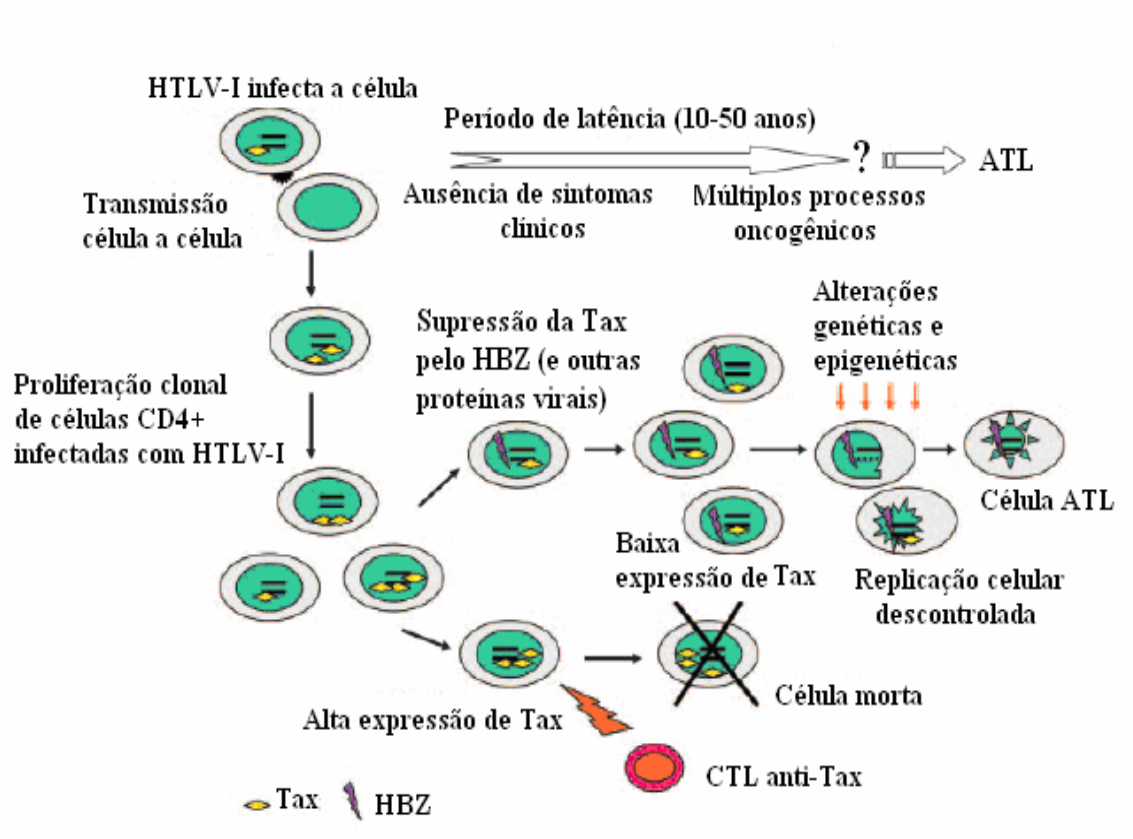

Figura 5 – Modelo proposto para a participação dos genes *tax* e *HBZ* na patogênese da ATL. Depois da infecção, o HTLV-I promove a proliferação clonal das células infectadas pela ação pleiotrópica da Tax. Se a expressão do gene *tax* se mantém, as células infectadas são detectadas pelo sistema imune e eliminadas. A expressão da Tax é suprimida pelos produtos de genes acessórios, como por exemplo, o gen *HBZ*. Estas células conseguem escapar da ação do sistema imune do hospedeiro e continuam proliferando pela ação do mRNA do gene *HBZ*. Depois de um longo período de latência, a ATL desenvolve-se em 5% dos portadores assintomáticos (Arisawa *et al*., 2000). A expressão da *tax* é inativada por muitos mecanismos, sugerindo que tax não é necessária nesse estágio. Alterações no genoma do hospedeiro, vão se acumulando durante o período de latência, levam ao desenvolvimento da ATL (Mesnard *et al*., 2006).

2. Justificativa

A Bahia é um dos estados brasileiros com maior prevalência de infecção pelo HTLV-I e onde existe uma das maiores coortes de DIH descrita. A manifestação desta doença parece estar relacionada com a possível manifestação da ATL e da HAM/TSP, outras doenças associadas ao HTLV-I, podendo representar um indicador prognóstico de condições patológicas associadas ao HTLV-I que possam vir ocorrer mais tardiamente. Porém, na literatura, poucos dados existem sobre a patogênese da DIH e não se conhecem os fatores relacionados com a sua manifestação.

A proteína Tax vem sendo apontada na literatura como uma das principais moléculas virais envolvidas na patogênese do HTLV-I por ser capaz de regular tanto a expressão dos genes virais como dos genes da célula hospedeira. (Matsuoka, M. & Jeang, K.T., 2007) Muitos artigos na literatura descrevem as diversas ações da proteína Tax, principalmente em modelos *in vitro*, no controle das vias de proliferação e apoptose na célula hospedeira.(Grassmann *et al*., 2005, Neuveut *et al*., 1998) Porém, o fato de que esta proteína não seja expressa majoritariamente nas células ATL, conduziu a hipótese de que ela somente seria necessária nas primeiras etapas da oncogênese relacionada ao HTLV-I. Recentes trabalhos mostram que a expressão de *tax* também é restrita à uma pequena percentagem dos pacientes de HAM/TSP (Saito *et al*., 2009). Estes dados, juntamente com a descrição do novo gene viral *HBZ* trouxeram uma nova discussão na literatura sobre o papel da Tax na patogênese do HTLV-I. O fato de que o gene *HBZ* se expressa majoritariamente nos pacientes de ATL e HAM/TSP abriu novas perguntas à respeito da importância do balanço na expressão destes dois genes para a patogênese das doenças associadas ao HTLV-I. (Matsuoka, M & Green, P., 2009)

Não existem dados sobre a expressão dos genes *tax* e *HBZ* na DIH. O conhecimento da expressão destes dois genes virais nesta doença associada ao HTLV-I pode contribuir de maneira importante no entendimento da sua patologia. A DIH é uma dermatite que ocorre geralmente com 18 meses após a infecção pelo HTLV-I, ao contrário da ATL, que ocorre geralmente de 40-60 anos após a infecção (Arisawa *et al*, 2000) e a HAM/TSP que ocorre numa faixa etária média de 46 anos*(*Moreno-Carvalho *et al.,* 1992*;* Nakagawa*,* 1995*).* e por esse motivo, o estudo da expressão dos genes virais em estágios mais iniciais após a infecção, podem ajudar esclarecer mecanismos e patologias do vírus e fornecer e identificar possíveis marcadores de manifestação e evolução tanto da DIH como de doenças de estágios mais tardios após a infecção.

3. Objetivo Geral:

Estudar a expressão dos genes virais *tax* e *HTLV-1 bZIP factor (HBZ*) na DIH

3.1 Objetivos específicos:

- Analisar a expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nas células T infectadas contidas nas PBMCs em pacientes de DIH.

- Quantificar a carga proviral do HTLV-I nos pacientes incluídos no estudo.

- Associar a expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* com a carga proviral e os parâmetros clínicos na DIH.

4. Metodologia

4.1 População estudada

Foram incluídos 32 pacientes de DIH acompanhados nos Serviços de Dermatologia e Neuropediatria do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Com-HUPES) e diagnosticados segundo critérios preestabelecidos (La Grenade *et al*., 1998; Oliveira *et al*., 2005) pelo grupo de pesquisa das manifestações infanto-juvenis da infecção pelo HTLV-1 HUPES/UFBA/FIOCRUZ. Também foram incluídos 10 portadores assintomáticos do HTLV-I da faixa infant-juvenil também acompanhados nos Serviços de Dermatologia e Neuropediatria do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (Com-Hupes). Todos os casos tiveram sorologia negativa para HIV e positiva para HTLV-1 por *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) e esses resultados foram confirmados por *western blot*.

Foram considerados como critérios de inclusão dos pacientes de DIH:

1) Pacientes com diagnóstico de DIH e/ou HAM/TSP com ou sem outras manifestações.
2) Pacientes naturais e procedentes do estado da Bahia;
3) Termo de consentimento livre e esclarecido assinado pela mãe ou outro responsável pela criança;

Foram considerados como critérios de exclusão para o grupo de pacientes de DIH e o grupo de portadores assintomáticos:

1) Pacientes com DIH ou portadores assintomáticos do HTLV-I e sorologia positiva para o vírus da imunodeficiência humana (HIV);
2) Pacientes naturais ou procedentes de outros estados da federação;
3) Consentimento informado não assinado pela mãe ou outro responsável pela criança;

No grupo dos pacientes de DIH, 11 foram do sexo masculino e 21 do sexo feminino (Tabela 1). A mediana da idade foi de 15,5. Dos 32 pacientes, 10 manifestavam também HAM/TSP, 8 apresentavam linfócitos atípicos no sangue periférico, sendo que em cinco deles foi observadas células me flor típicas da ATL (Oliveira *et al*., submetido). No momento da coleta, 21 estavam com doença em atividade e 11 em remissão (Tabela 1). A mediana do tempo de doença para este grupo de doentes, calculada como o tempo em meses entre o diagnóstico e o momento da coleta foi de 146 meses (intervalo: 19 – 237 meses).

Tabela 1: Características dos Pacientes com DIH estudados.

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS
Total de pacientes	32
Mediana de idade (anos)	15 (± 4,88)
Sexo – nº (%)	
Masculino	11 (34%)
Feminino	21 (66%)
Doença – nº (%)	
Atividade	21 (66%)
Remissão	11 (34%)
Associação com HAM/TSP – nº (%)	
(+)	11 (34%)
(-)	21 (66%)

Dentro do grupo dos portadores assintomáticos, 09 foram do sexo masculino e 01 do sexo feminino. A mediana de idade deste grupo foi de 12,5 (Tabela 2)

Tabela 2: Características dos portadores assintomáticos do HTLV-I estudados.

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS
Total de portadores assintomáticos	10
Mediana de idade (anos)	12,5 (± 7,17)
Sexo – nº (%)	
Masculino	09 (90%)
Feminino	01 (10%)

4.2 Obtenção das amostras e extração de RNA e DNA

Foram coletados 20 ml de sangue periférico, do qual foram separadas as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) por gradiente de ficoll. Uma alíquota de 7 milhões destas PBMC foi ressuspendida em reagente TRIZOL (Invitrogen™). Para extração de RNA, foram acrescentados 200µL de clorofórmio e a mistura centrifugada a 12.000 rpm durante 15 minutos. O RNA foi precipitado com isopropanol e lavado com 1mL de etanol 75%. O pellet foi ressuspendido em água livre de RNAse, incubado a 57ºC por 10 minutos e o RNA tratado com DNAse livre de RNAse. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro e a sua qualidade foi avaliada em gel de agarose 1%.

Uma alíquota de 1 milhão de células foi usada para extração de DNA. As células foram tratadas com 100µg de proteinase K durante 2h a 65ºC. Posteriormente foi adicionado UltraPure™ Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamilico (Invitrogen™) à uma proporção de (25:24:1, v/v) e o DNA da fase aquosa foi precipitado com etanol absoluto e lavada com etanol 75%. O DNA foi quantificado e a sua qualidade foi avaliada em gel de agarose 1%.

4.2.1 Obtenção do cDNA

Foi realizada uma única reação de transcrição reversa onde utilizou-se *primers* específicos para os genes estudados. Para o controle constitutivo *β2-microglobulina*, o primer foi o *β* -2mR 5´ - GACAAGTCTGAATGCTCCAC – 3, para os transcritos HBZ e HBZ-SI, utilizou-se o primer AS2 5-TCTTCCTCCAAGGATAATAGCCCGTCCA-3 (Kamihira *et al*, 2006), para a obtenção dos cDNAs antisense, pois essa sequência permite a amplificação dos dois transcritos. Por fim, para o gene *tax,* utilizou-se o primer Taxantisense 5´-TGAGCTTATGATTTGTCTTCA – 3´. Para essa reação de transcrição reversa utilizou-se o *KIT Superscript III* (Invitrogen™). A quantidade de RNA total utilizada para a transcrição reversa de cada amostra foi de 140 ng, ao qual adicionou-se 2µM do oligonucleotídeos específicos, 1µl do tampão de anelamento contendo inibidor de RNAses e 2,0 µl de água livre de DNAse. A mistura foi então incubada em um termociclador a 65 ºC por 5 minutos, depois incubada em gelo e centrifugada. Foram adicionados 10µL de 2X *Firs-Strand Reaction Mix* e 2µL do *Superscript III Enzime Mix* e incubados novamente num termociclador à 50ºC durante 50 minutos e 85ºC durante 5 minutos.

4.3 Quantificação da expressão dos genes virais *tax* e *HBZ*

Como foram descritos dois transcritos distintos para o gene *HBZ*, o *HBZ* e o *HBZ-SI,* foram realizadas duas quantificações e por tanto construídos dois plasmídeos para obtenção da curva padrão, contendo regiões diferentes do gene. Para a obtenção do inserto, amplificou-se a região de interesse a partir do cDNA obtido da linhagem MT-2, infectada pelo HTLV-I.

4.3.1 Obtenção dos plasmídeos para a construção das curvas padrão

Foram construídos quatro plasmídios, um contendo um fragmento correspondente à região de interesse do transcrito do gene *tax*, um segundo contendo um fragmento correspondente à região de interesse do transcrito *HBZ,* um terceiro contendo um fragmento correspondente à região de interesse do transcrito *HBZ-SI* (produtos do gene *HBZ*) e um quarto contendo um fragmento correspondente à região de interesse do transcrito do gene *β2-microglobulina* (controle endógeno humano). Para

obtenção destes insertos, partimos dos cDNAs obtidos da linhagem MT-2 como descrito anteriormente.

Para obtenção do fragmento para a clonagem, correspondente ao transcrito do gene *tax* foram usados os oligos Taxsense e Taxantisense, na concentração de 0,4 µM em 2,5 µL de Tampão 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 0,4 mM de dNTP (Qiagen), 2 mM de $MgCl_2$, e 1,25 unidades de Taq Polimerase (Invitrogen™). As condições de amplificação foram: 94º C por 5min, 94º C por 45seg, 56º C por 1min, 72º C por 1min e 30seg e 72º C por 5min num total de 34 ciclos.

Para obtenção do fragmento para a clonagem correspondente ao transcrito *HBZ* do gene *HBZ* foram usados os oligos AS5 e AS4 (Tabela 3) na concentração de 0,4µM em 2,5µL de Tampão 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 0,4 mM de dNTP (Qiagen), 1,5 mM de $MgCl_2$, e 1,25 unidades de Taq Polimerase (Invitrogen™). As condições de amplificação foram: 95º C por 5min, 95º C por 30seg, 55ºC por 30seg, 72º C por 40seg e 72º C por 5min num total de 34 ciclos.

Para obtenção do fragmento para a clonagem correspondente ao transcrito *HBZ-SI* do gene *HBZ* foram usados os oligos AS4 e AS7 (Tabela 3) na concentração de 0,4mM em 2,5µL de Tampão 10X (200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 0,4 mM de dNTP (Qiagen), 1,5 mM de $MgCl_2$, e 1,25 unidades de Taq Polimerase (Invitrogen™). As condições de amplificação foram: 95º C por 5min, 95º C por 45seg, 55ºC por 45seg, 72º C por 45seg e 72ºC por 5min num total de 34 ciclos.

Para obtenção do fragmento para a clonagem correspondente ao transcrito do gene *β2-microglobulina* foram usados os oligos β-2mF e β-2mR (Tabela 3) na concentração de 0,4 µM em 2,5 µL de Tampão 10X (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl), 0,4 mM de dNTP (Qiagen), 1,5 mM de $MgCl_2$, e 1,25 unidades de Taq Polimerase (Invitrogen™). As condições de amplificação foram: 95º C por 5min, 95º C por 30seg, 55ºC por 30seg, 72º C por 40seg e 72º C por 5min num total de 34 ciclos.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores para obtenção do fragmento dos genes *tax*, *HBZ (*HBZ e HBZ-SI*)* e *β2-microglobulina* utilizados para a construção dos plasmídeos.

Oligo	Seqüência	Utilização
Taxsense	5´- TCGAAACAGCCCTRCAGATA – 3	PCR para *tax* (sense)
Taxantisense	5´-TGAGCTTATGATTTGTCTTCA – 3´	PCR para *tax* (antisense)
AS5	5´-CATACAACCCCCAACATTCC-3´	PCR para *HBZ* (sense)
AS4	5´-CTTCCTCTTCTCCTCAGCCC-3´	PCR para *HBZ* e *HBZ-SI* (antisense)
AS7	5´-AGATCGAAAGTTCCACCCCT– 3´	PCR para *HBZ-SI* (sense)
β -2mF	5´- CATCCAGCGTACTCCAAAGA – 3´	PCR para β2 (sense)
β -2mR	5´ - GACAAGTCTGAATGCTCCAC – 3´	PCR para β2 (antisense)

Os produtos das PCR anteriores foram visualizados em gel de poliacrilamida, purificados e seqüenciados para comprovar que as seqüências amplificadas eram as seqüências de interesse. Esta comprovação foi realizada utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)(www.ncbi.nlm.nih.gov)*. Posteriormente os fragmentos foram clonados no plasmídeo pGEM-T Easy Vector utilizando o kit pGEM-T Easy Vector (Promega) a temperatura ambiente durante uma hora. Para essa reação foi utilizado 50 ng do fragmento a ser inserido 5µL do 2X Tampão de ligação, T4 DNA Ligase, 1µL do vector (50ng) e 1µL da enzima de ligação T4 DNA Ligase (3 unidades/ µL).

Para a transformação, 2µL da reação de ligação foram transfectados a 50µL de bactérias competentes (JM109 Competent Cells - Promega) por choque térmico a 42ºC durante 50 segundos e posteriormente por 2 minutos em gelo. Foram adicionados 900µL de meio SOC e as bactérias foram incubadas a 37º C com agitação por 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, 100µL da solução de bactérias foram plaqueados em placas de ágar com ampicilina (100µg/mL), IPTG (100mM) e X-Gal (50mg/mL) incubadas a 37ºC durante por 18 horas. Um mínimo de 5 colônias brancas (positivas para o inserto) foram coletadas e incubadas em meio LB com ampicilina durante 12 horas a 37ºC. A purificação dos plasmídeos foi realizada utilizando o kit *PureYield*^{TM} *Plasmid Midiprep System* (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Após purificação e quantificação, os plasmídeos foram submetidos à restrição com o Enzima *Eco*RI para comprovação da presença dos insertos de interesse. As bandas correspondentes aos

insertos foram purificadas, visualizadas em gel de agarose à 1% e seqüenciadas, para comprovar que as seqüências inseridas nos plasmídios correspondiam aos fragmentos de interesse, utilizando a ferramenta *BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov)*.

4.3.2 Obtenção das curvas padrão

Os plasmídeos purificados foram quantificados em um espectrofotômetro e diluídos em série para a construção da curva-padrão no intervalo de 10^9 – 10^1 plasmídios. As reações foram realizadas em um termociclador *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) utilizando o kit *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). As condições de reação do PCR em tempo real para a curva de quantificação da expressão do gene *tax* foram: 50º por 2min, 95º por 10min, 95º por 15seg e 60 º por 1min, num total de 40 ciclos. A dissociação foi feita com 95º por 15seg, 60º por 1min e 95º por 15seg, utilizando os oligos TaxFWRT e TaxRERT, descritos na Tabela 4.

As condições de reação para a curva de quantificação da expressão do gene *HBZ,* transcrito *HBZ* foram: 50º por 2min, 95º por 10min, 95º por 15seg e 60 º por 1min, num total de 40 ciclos. A dissociação foi feita com 95º por 15seg, 60º por 1min e 95º por 15seg, utilizando os oligos S1 e AS6, descritos na Tabela 4.

As condições de reação para a curva de quantificação da expressão do gene *HBZ,* transcrito HBZ-SI foram: 50º por 2min, 95º por 10min, 95º por 15seg e 60 º por 1min, num total de 40 ciclos. A dissociação foi feita com 95º por 15seg, 60º por 1min e 95º por 15seg, utilizando os oligos AS3 e AS6, descritos na Tabela 4.

As condições de reação para a curva de quantificação da expressão do gene *β2-microglobulina* foram: 50º por 2min, 95º por 10min, 95º por 15seg e 60 º por 1min, num total de 40 ciclos. A dissociação foi feita com 95º por 15seg, 60º por 1min e 95º por 15seg, utilizando os oligos *β*-2mF e *β*-2mR, descritos na Tabela 4.

Os dados foram analisados mediante o software *7500 software v2.0.1* (Applied Biosystems) e foram considerados o coeficiente de correlação (R^2), que mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de Ct das amostras padrão, e o *Slope*, que indica a eficiência da amplificação para o ensaio. Como as curvas foram construídas utilizando o SYBR Green (Applied Biosystems), um corante que se liga em ligações por pontes de hidrogênio, e, portanto, pode se associar à nucleotídeos que não são os estudados, foi necessário verificar a curva de dissociação

que fornece os resultados da especificidade da amplificação e em todos os casos, essas curvas apresentaram apenas um pico, sugerindo especificidade da reação.

4.3.3 Amplificação das amostras

Posteriormente foram avaliadas as amostras partindo de 1µ de cDNA para cada reação. As avaliações foram feitas em duplicata e a curva padrão foi repetida para cada placa.

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para a técnica de PCR quantitativo em tempo real para os genes *tax*, *HBZ (*transcritos HBZ e HBZ-SI) e *β2-microglobulina*.

Oligo	Seqüência	Utilização
TaxFWRT	5´-CGAAAAAGACGCAGATGACAATG–3´	PCR Real-Time para *tax* (sense)
TaxRERT	5´- AAATGTTTTTCACTGAGAGGCTCTAAG – 3´	PCR Real-Time para *tax* (antisense)
S1	5-CAGTAGGGCGTGACGATGTA-3	PCR Real-Time para *HBZ* (sense)
AS6	5-CAAGGATAATAGCCCGTCCA-3	PCR Real-Time *HBZ* e *HBZ-SI* (antisense)
AS3	5´- CCGCCGTCTAGGTAAGTTTA – 3´	PCR Real-Time para *HBZ-SI* (sense)
β -2mF	5´- CATCCAGCGTACTCCAAAGA – 3´	PCR Real-Time β2 (sense)
β -2mR	5´ - GACAAGTCTGAATGCTCCAC – 3´	PCR Real-Time β2 (antisense)

4.4 Quantificação da carga proviral

A carga viral foi calculada por amplificação em tempo real da região pol do HTLV-1 pelo sistema TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) como descrito anteriormente (Dehée *et al*., 2002). Para a construção das curvas de referência para o gene pol e para o gene da albumina (controle endógeno humano) foi utilizado um plasmídeo que contém os dois fragmentos de DNA de interesse nas diluições 10^6-10^1. Os oligos e sondas estão descritos na Tabela 5. Para avaliação das amostras, foram amplificados 200 ng de DNA. A mistura de 25 µl de PCR tanto para HTLV-I quanto para a albumina consistia de 200 nM de cada um dos oligonucleotídeos e 100 nM das respectivas sondas descritos na Tabela 5, 200 nM de dATP, dGTP e dCTP, 400 nM de dUTP, 7 mM de $MgCl_2$, 0.5 unidade de uracil DNA glicosilase, 1,25 unidades de *Taq* polimerase e 1X de Tampão de PCR. As condições de amplificação foram: 50º por 2min, 95º por 10min, 95º por 15seg e 65 º por 1min, num total de 45 ciclos. A carga viral foi expressa como número de cópias do HTLV-1/célula do PBMC.

Tabela 5 - Oligonucleotídeos e sondas utilizados para a quantificação da carga proviral por PCR em tempo real.

Oligo/Sonda	Seqüência	Tamanho(pb)
SK 110	5´-CCCTACAATCCAACCAGCTCAG-3´	186
SK 111	5´-GTGGTGAAGCTGCCATCGGGTTTT-3´	
Sonda HTLV	5´-FAM-CTTTACTGACAAACCCGACCTACCCATGGA-3´-TAMRA-3´	
Alb-S	5´-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3´	141
Alb-AS	5´-AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT-3´	
Sonda Albumina	5´-FAM-CCTGTCATGCCCACACAAATCTCTCC-TAMRA-3´	

4.5 Considerações éticas

Os responsáveis legais autorizaram a participação voluntária dos menores e a criopreservação do material biológico na assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética do HUPES/UFBA (Registro da CONEP nº 13097) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

4.6 Análise estatística

Os dados dos pacientes foram registrados num banco de dados e analisados com o programa GraphPad Prism v. 5.02 para a avaliação estatística. Foram calculadas as medianas da idade, tempo de doença, dos valores de carga viral e dos valores de expressão dos genes *tax* e *HBZ*. A comparação de dados entre dois grupos foi realizada através do teste de Mann-Whitney U e para a correlação de variáveis entre grupos foi utilizado o teste de Spearman´s rank. Uma probabilidade de $p \leq 0,05$ foi considerada significativa.

5. Resultados

5.1 Expressão dos genes *HBZ* (transcritos HBZ e HBZ-SI) e *tax* em portadores do HTLV-1 na faixa infanto-juvenil.

5.1.1 Construção das curvas padrão para quantificação dos genes estudados.

Para a curva padrão correspondente ao transcrito HBZ-SI do gene *HBZ* obteve-se um R^2 de 0.99 e um *Slope* de -3,2 (Figura 6). Para o gene *HBZ* transcrito *HBZ* obteve-se um R^2 de 0.98e um *Slope* de -3,8 (Figura 7) e para o gene *tax* obteve-se um R^2 de 0.99e um *Slope* de -3,6 (Figura 8). Para a curva de expressão do gene utilizado como controle constitutivo humano que codifica para a *β2-microglobulina*, obteve-se coeficiente de correlação com valor 0,99 e *Slope* -3,3 (Figura 9). As curvas de dissociação para todas as amplificações apresentaram apenas um pico, sugerindo especificidade da reação.

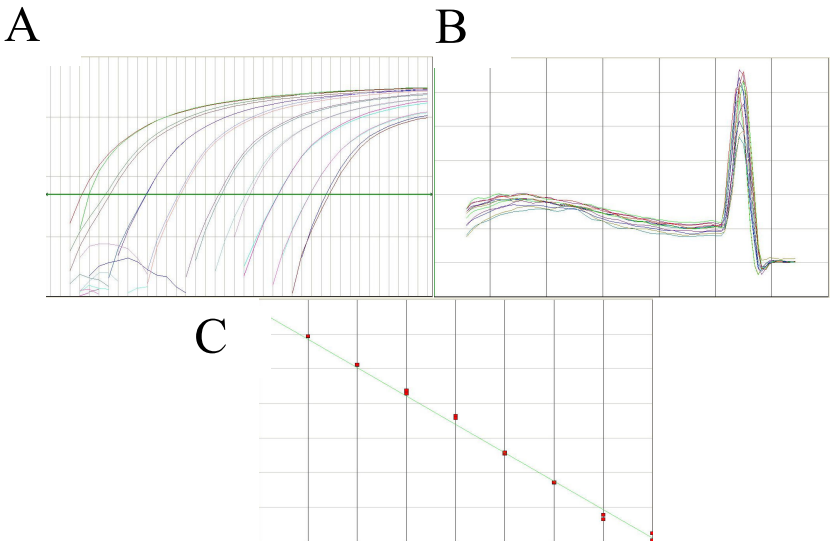

Figura 6. (A) *plot* da curva padrão otimizada para o gene *HBZ*, para o transcrito HBZ-SI. Os pontos da curva representam uma diluição seriada (10^9-10^1). (B) o gráfico referente à curva de dissociação. (C) Reta de regressão linear que permite o cálculo do coeficiente de correlação (R^2) e o *Slope* da curva.

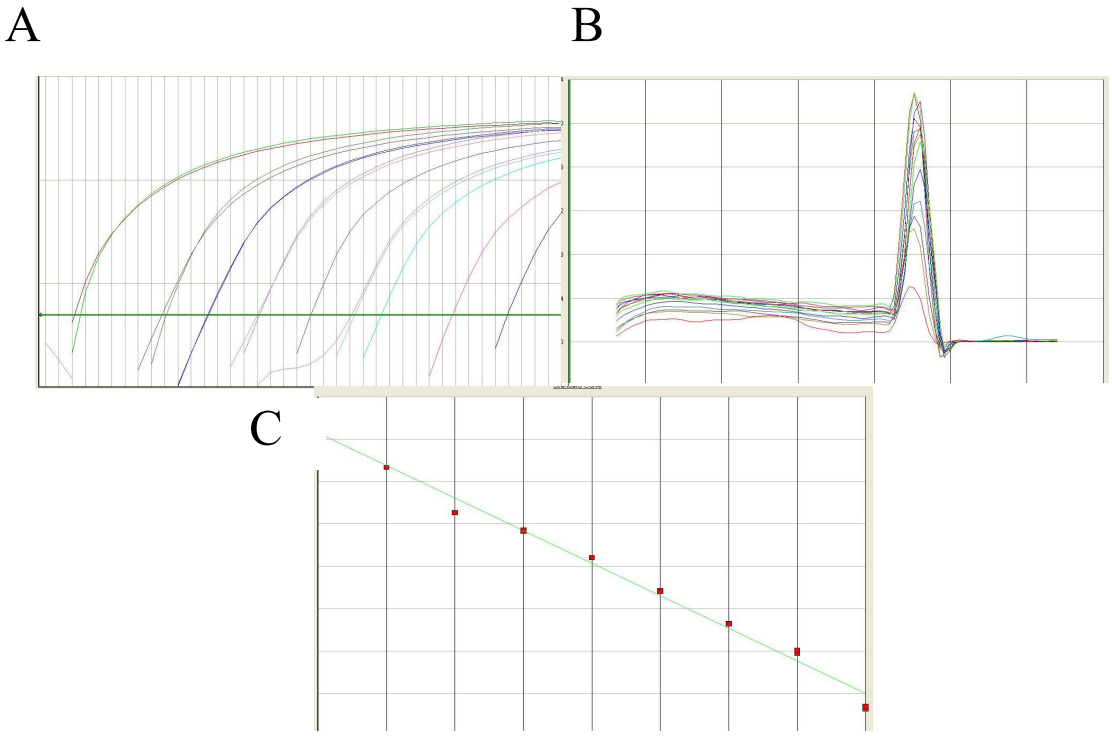

Figura 7: (A) Curva padrão otimizada para o gene *HBZ* para o transcrito *HBZ*. Os pontos da curva representam uma diluição seriada (10^9-10^1). (B)Gráfico referente à curva de dissociação. (C) Reta de regressão linear que permite o cálculo do coeficiente de correlação (R^2) *Slope* da curva.

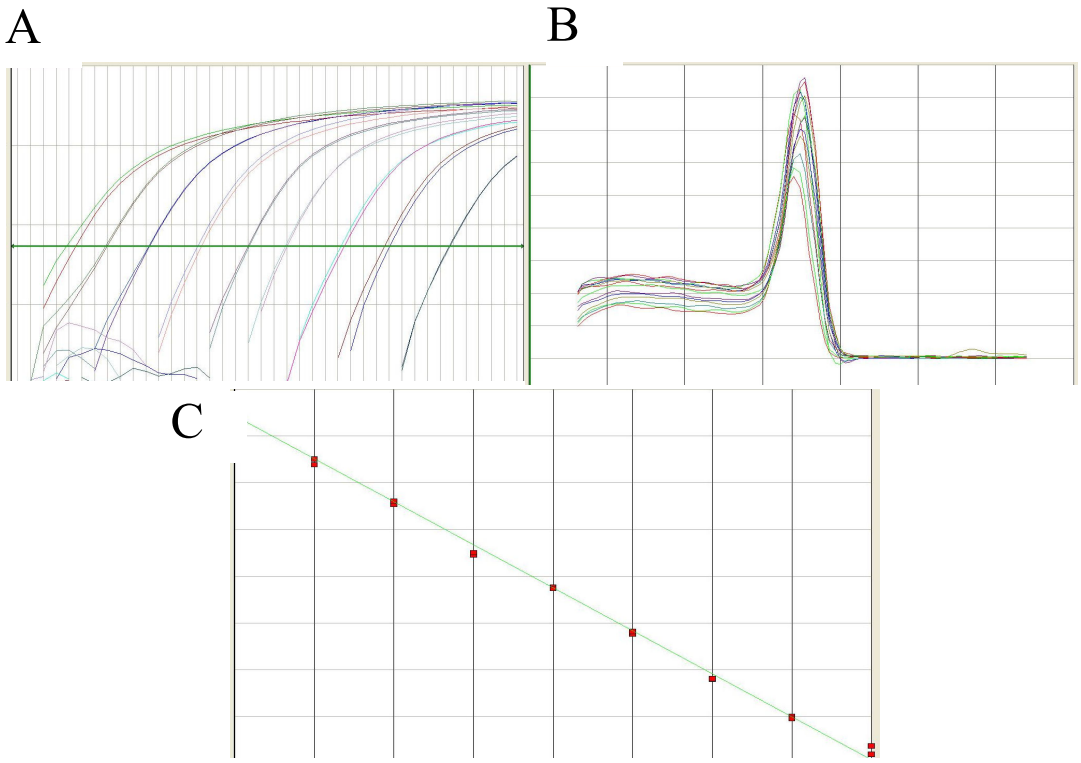

Figura 8: (A) Curva padrão otimizada para o gene HBZ para o transcrito *HBZ-SI*. Os pontos da curva representam uma diluição seriada (10^9-10^1). (B) Gráfico referente à curva de dissociação. (C) Reta de regressão linear que permite o cálculo do coeficiente de correlação (R^2) *Slope* da curva.

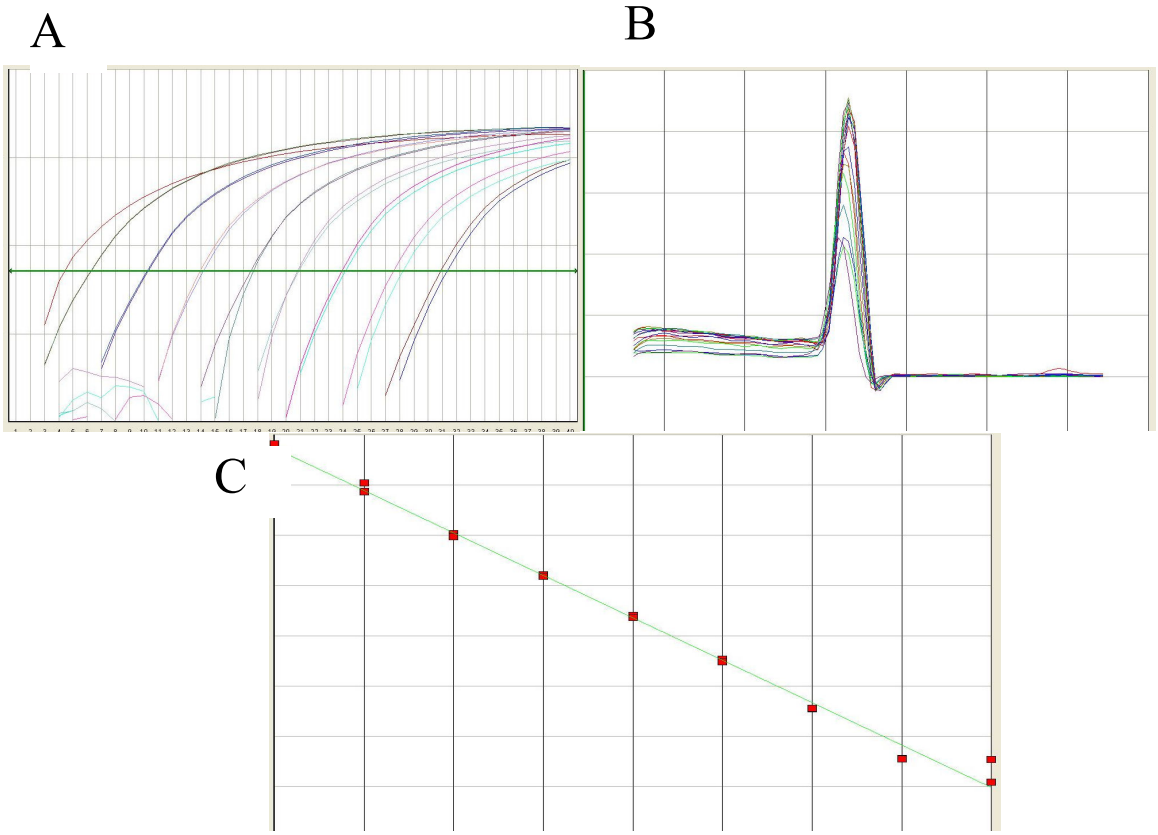

Figura 9. (A) Curva padrão otimizada para o gene que codifica para a *β2-microglobulina.* Os pontos da curva representam uma diluição seriada (10^9-10^1). (B) Gráfico referente à curva de dissociação. (C) Reta de regressão linear que permite o cálculo do coeficiente de correlação (R^2) *Slope* da curva.

5.1.2 Expressão dos genes *HBZ* (transcritos *HBZ* e *HBZ-SI*) e *tax* nos pacientes de DIH.

As amostras correspondentes aos 32 pacientes de DIH incluídos e aos 10 portadores assintomáticos amplificaram para os genes estudados. Nos pacientes com DIH (Tabela 6), em 2 das 32 amostras amplificadas para o transcrito HBZ (gene *HBZ*) e em 8 amplificadas para o transcrito do gene *tax* observou-se valores de amplificação inferiores à uma cópia. Todas as amostras amplificaram com valores superiores a uma cópia para o transcrito HBZ-SI nesses pacientes. Já nos portadores assintomáticos (Tabela 7), em 2 das 10 amostras amplificadas para o transcrito HBZ e em 6 das 10 amplificadas para o transcrito do gene *tax*, observou-se valores de amplificação inferiores a uma cópia. Para o transcrito HBZ-SI, todas tiveram níveis de amplificação superior a uma cópia.

Tabela 6: Amplificação das amostras para os genes estudados no grupo de pacientes de DIH.

	HBZ-SI	**HBZ**	***tax***
< 1 cópia	00	02	08
>/=1 cópia	32	30	24
Total (Amostras)	**32**	**32**	**32**

Tabela 7: Amplificação das amostras para os genes estudados no grupo de portadores assintomáticos.

	HBZ-SI	**HBZ**	***tax***
< 1 cópia	00	02	06
>/=1 cópia	10	08	04
Total (Amostras)	**10**	**10**	**10**

Nos pacientes de DIH, a expressão do transcrito HBZ-SI foi maior que a expressão do transcrito HBZ (Figura 10), com mediana de 45,80 (2,45 – 264,35) cópias

de mRNA por 140ng de RNA total e 12,48 (0,21 – 762,59) cópias de mRNA respectivamente (p = 0,0080, teste Mann Whitney). O gene *tax* apresentou mediana de expressão de 3,777 (0,01 – 136,708) cópias de mRNA. Este valor foi estatisticamente menor que a expressão do gene *HBZ*, tanto para o transcrito HBZ-SI (p<0, 0001, teste Mann Whitney) quanto para o transcrito HBZ (p = 0,0029, teste Mann Whitney).

Os valores de expressão dos genes estudados foram ajustados pela expressão do gene que codifica para da *β2-microglobulina* (Figura 10, (B), (D) e (F)). Nos pacientes de DIH, a expressão dos dois transcritos do gene *HBZ* continuou sendo estatisticamente maior à expressão do gene *tax* (p= 0,0006 para o HBZ-SI e p= 0,0123 para o transcrito HBZ, teste Mann Whitney), porém perdeu-se a diferença estatisticamente significante observada entre a expressão de HBZ-SI e HBZ.

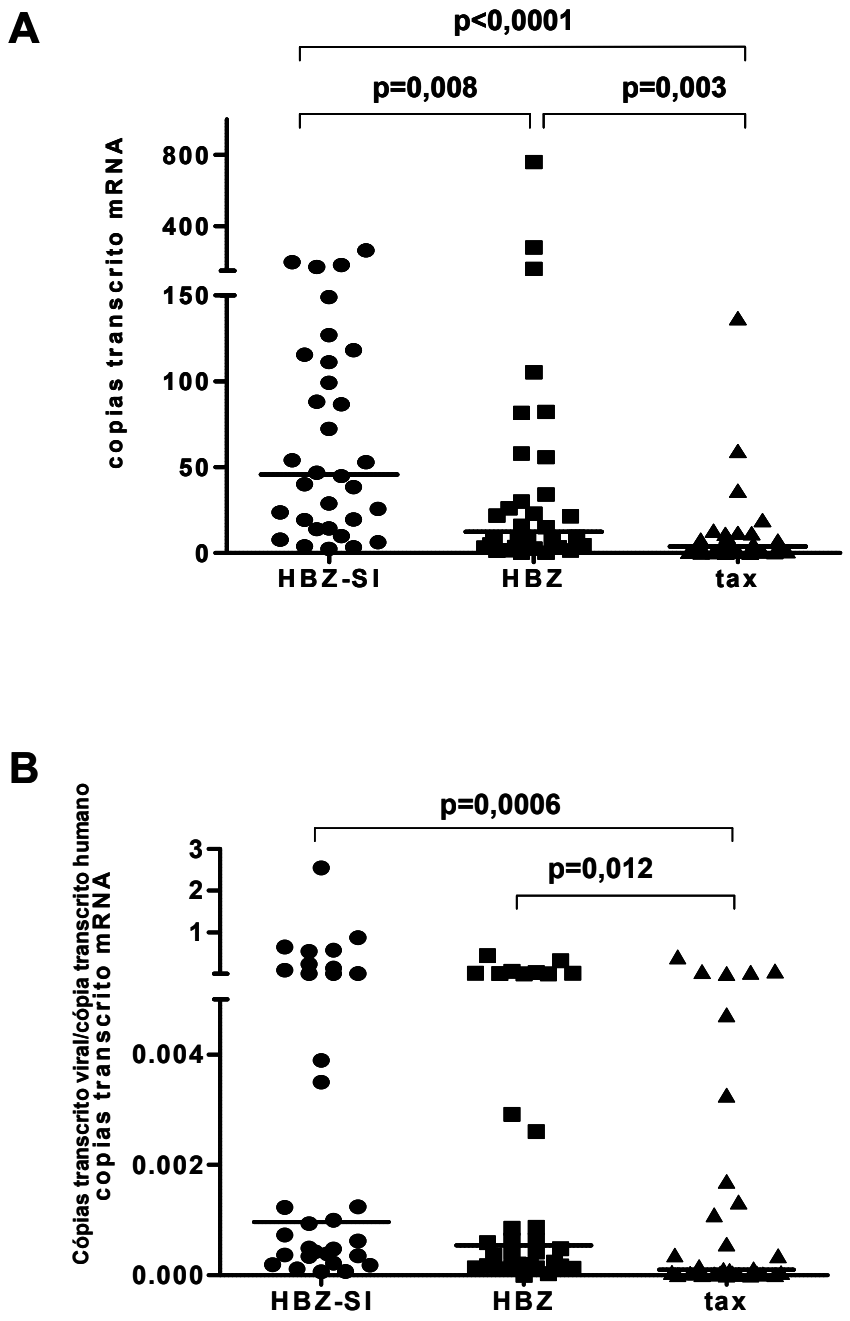

Figura 10: Expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nos pacientes de DIH. Os níveis dos transcritos se expressam como cópias de transcrito em 140 ng de RNA total.. (A) Valores não ajustados. (B) valores ajustados pela expressão da *β2-microglobulina*.

Nos portadores assintomáticos, encontrou-se níveis similares nos dois transcritos oriundos do gene *HBZ*, sendo a mediana da expressão do transcrito HBZ-SI 5,89 (3,36 – 87,93) e do transcrito HBZ 2,94 (0,25 – 68,345) cópias de mRNA (p= 0.1655, teste Mann Whitney). A mediana da expressão do gene *tax* nos assintomáticos foi de 0,7475 (0,081 – 9,193) cópias de mRNA, e este valor somente foi estatisticamente significante comparado com a expressão do transcrito HBZ-SI (p=0,0029, teste Mann Whitney).

Quando os dados foram ajustados pelo gene que codifica para *β2-microglobulina* (Figura 11), manteve-se a maior expressão do transcrito HBZ-SI do gene *HBZ* em relação ao gene *tax* (p = 0.0288, teste Mann Whitney).

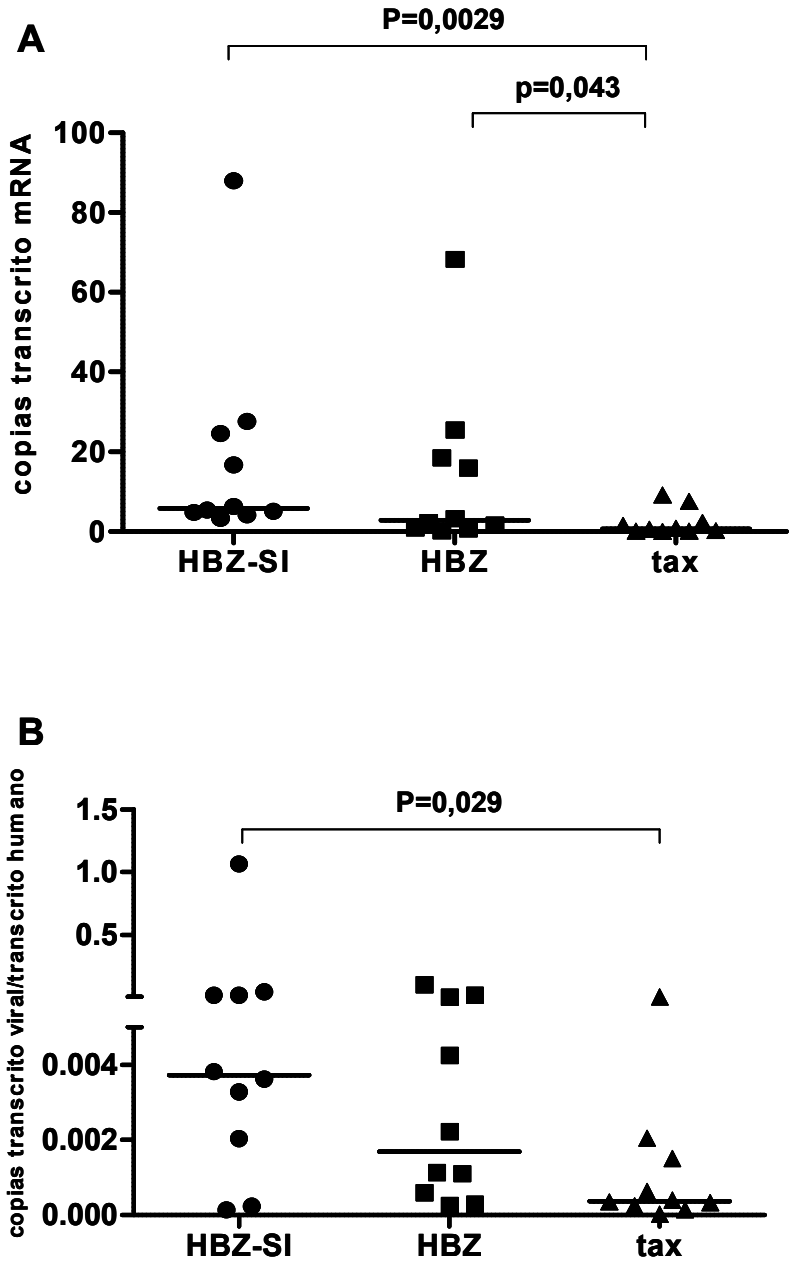

Figura 11: Expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nos portadores assintomáticos. Os níveis dos transcritos se expressam como copias de transcrito em 140 ng de RNA total.. (A) Valores não ajustados. (B) valores ajustados pela expressão da *β2-microglobulina.*

5.1.3 Correlação entre os níveis de expressão dos genes virais *HBZ* e *tax*.

Nos pacientes de DIH, expressão do transcrito HBZ-SI correlacionou positivamente com a expressão do transcrito HBZ ($p<0.0001$, $r= 0,7229$, teste Spearman r, Figura 12A). Esta correlação também se observou nos valores da expressão ajustados (Figura 12 B) pelo controle constitutivo humano ($p<0.0001$, $r=0,8581$, teste Spearman r). Também foi correlacionada a expressão de cada um dos transcritos do gene *HBZ* com a expressão de *tax*. Foi observada correlação positiva do gene *tax* com o transcrito HBZ-SI (Figura 12 C) em dados brutos ($p=0.003$, $r= 0,5077$, teste Spearman,) e em dados ajustados (Figura 12 D) com o controle constitutivo ($p<0.0001$, $r= 0,7185$, teste Spearman) com o transcrito HBZ ($p<0.0001$, $r=0,6221$, teste Spearman, Figura 12 E) em dados brutos e ajustados (Figura 11F) também pelo gene que codifica para a *β2-microglobulina* ($p<0.0001$, $r=0,7804$, teste Spearman). Nos portadores assintomáticos, não foram observadas estas correlações.

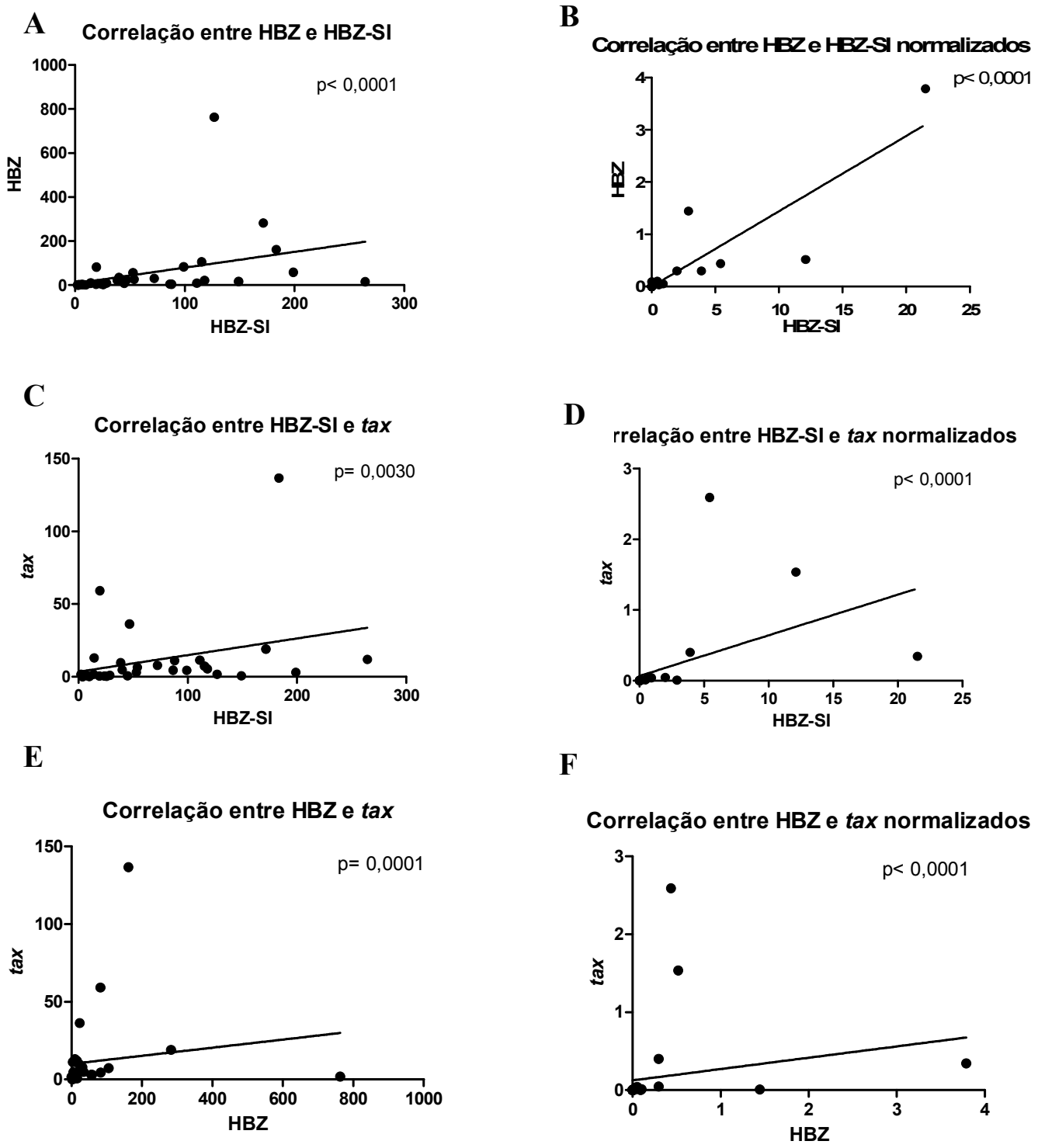

Figura 12: Correlação da expressão do gene HBZ(transcritos HBZ-SI com HBZ) e com o gene *tax* nos pacientes de DIH. Figuras (A), (C) e (E), valores não normalizados. Figuras (B), (D) e (F), valores ajustados pela expressão do gene que codifica para *β2-microglobulina*.

5.1.4 Comparação entre a expressão dos genes *HBZ* e *tax* entre os pacientes de DIH e os portadores assintomáticos.

Posteriormente comparou-se a expressão destes genes entre o grupo de pacientes de DIH e o grupo de portadores assintomáticos na faixa infanto-juvenil (Figura 13). Observou-se maior expressão, em dados não ajustados do transcrito HBZ-SI nos pacientes de DIH a respeito dos portadores assintomáticos, (p = 0,0079, teste Mann Whitney). Para o transcrito HBZ, a expressão foi similar (p = 0,0982, teste Mann Whitney). Já para o gene *tax*, também foi observada maior expressão nos pacientes com DIH que nos portadores assintomáticos (p = 0,0323, teste Mann Whitney).

Comparando os dados corrigidos pelo controle constitutivo, não se identificou diferenças estatisticamente significativas entre estes grupos para a expressão destes genes (Figura 14).

5.2 Correlações entre a expressão dos genes virais *HBZ* e *tax* e a carga proviral.

A extração de RNA foi feita a partir PBMC onde se encontra uma mistura de células infectadas e células não infectadas. A percentagem de células infectadas na amostra inicial pode ser estimada através da carga viral. Para avaliar se os níveis de expressão dos genes virais estavam relacionados com a quantidade de células infectadas na amostra de partida ou com uma maior expressão destes genes por célula infectada, foi correlacionada à expressão dos genes virais com a carga viral. A mediana da carga viral (expressa como número de cópias do HTLV-1/célula do PBMC) nos pacientes de DIH foi de 0,13953 (0,00855 - 0,33125). Esta foi menor nos portadores assintomáticos (mediana 0, 00025, 0,00001 - 0,31698, p= 0.0005 , Mann Whitney test).

Para os pacientes de DIH, não foram observadas correlações entre a carga proviral e a expressão dos transcritos HBZ-SI (p= 0.1393, r= 0,2672 teste Spearman), HBZ (p= 0.1200, r= 0,2804 teste Spearman) e para o gene *tax* (p= 0.6038, r= 0.0953 , teste Spearman). Na expressão dos portadores assintomáticos, também não foi observada esta correlação.

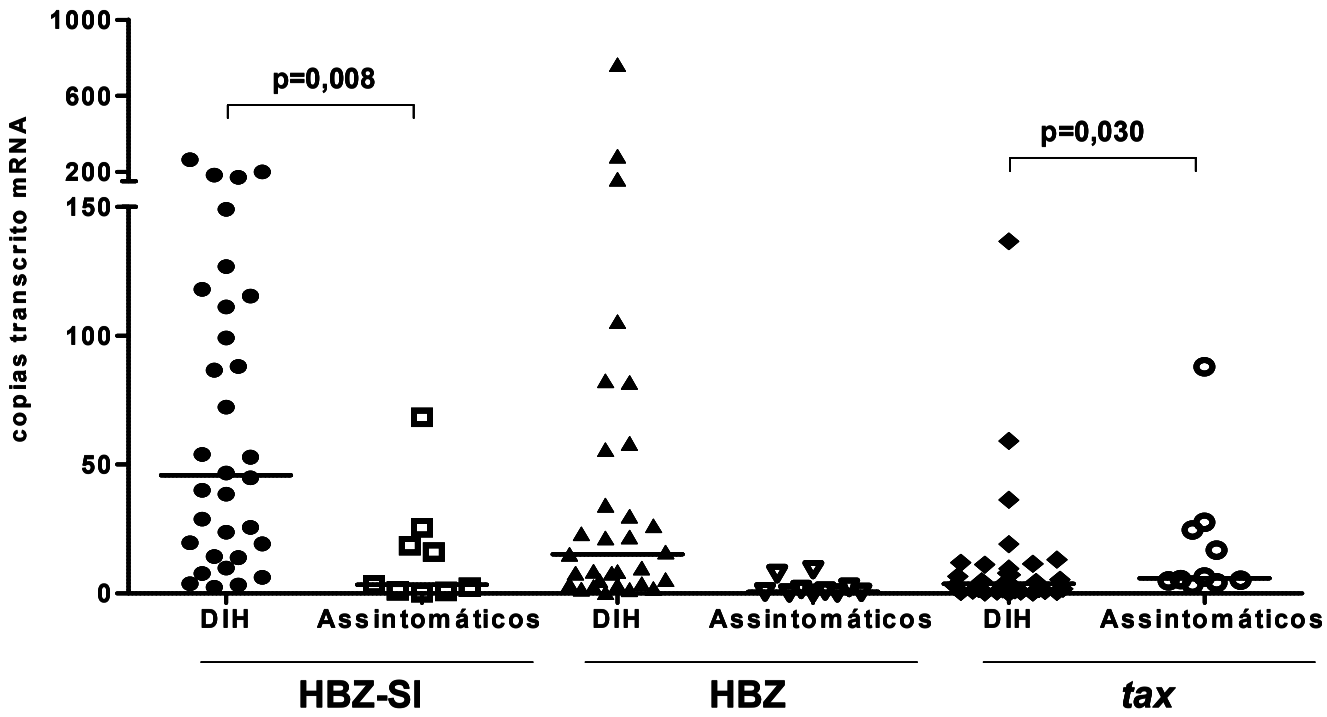

Figura 13: Expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nos pacientes de DIH e nos portadores assintomáticos. Os níveis dos transcritos se expressam como cópias de transcrito em 140 ng de RNA total.

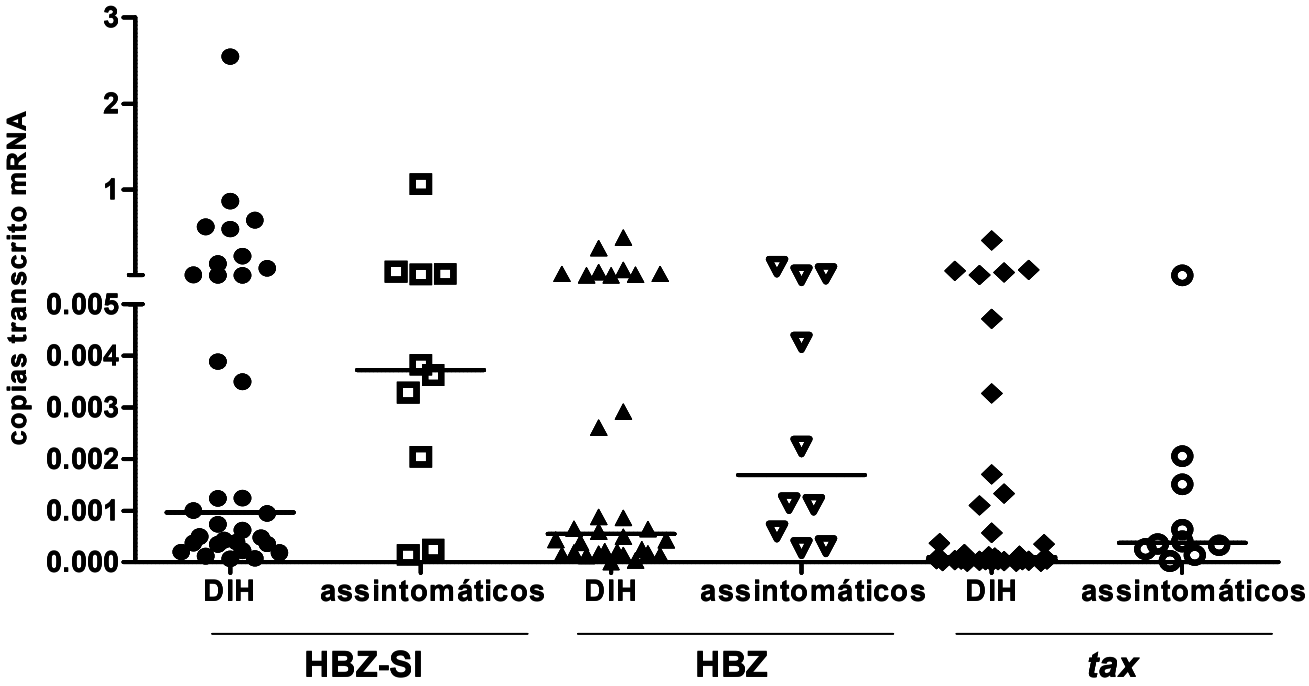

Figura 14: Expressão dos genes virais *tax* e *HBZ* nos pacientes de DIH e nos portadores assintomáticos. Os níveis dos transcritos se expressam como cópias de transcrito em 140 ng de RNA total ajustados pela expressão do gene humano da *β2-microglobulina*.

5.3 Relação entre a expressão dos genes virais *HBZ* e *tax* e os dados clínicos dos pacientes de DIH.

5.3.1 Relação entre a expressão dos genes *HBZ* e *tax* e o tempo de infecção.

Para esta análise foram incluídos 30 pacientes de DIH que adquiriram o vírus através da amamentação. Todas as mães destes pacientes apresentavam sorologia positiva para HTLV-1. Foram excluídos dois pacientes por não conhecer a data de infecção, um que adquiriu o vírus por transfusão sanguínea e qual mãe tem sorologia negativa para HTLV-1 e outro paciente órfão. Como o vírus foi adquirido por via vertical pela amamentação, a idade dos pacientes informa sobre o tempo aproximado de infecção. Com o intuito de avaliar se os níveis de expressão dos genes *tax* e *HBZ* se relacionaram com o tempo de infecção, correlacionou-se a idade dos pacientes no momento da coleta com a expressão destes genes. Não foi observada correlação entre a idade e a expressão dos genes *HBZ*, tanto para o transcrito HBZ-SI (p= 0, 2736, r= -0,03126, teste de Spearman), quanto para o HBZ (p= 0,196, r= -0,1553 teste Spearman r) e *tax* (p= 0,2334, r= 0,02501, teste de Spearman). Esses dados foram ajustados pelos valores de expressão do controle constitutivo e pela carga proviral (Figura 15) dos pacientes e não se observou correlações para o HBZ-SI (p = 0,8674, r = -0,03126), HBZ (p= 0,4041, r= -0,1553) e *tax* (p= 0,8938, r= 0,02501).

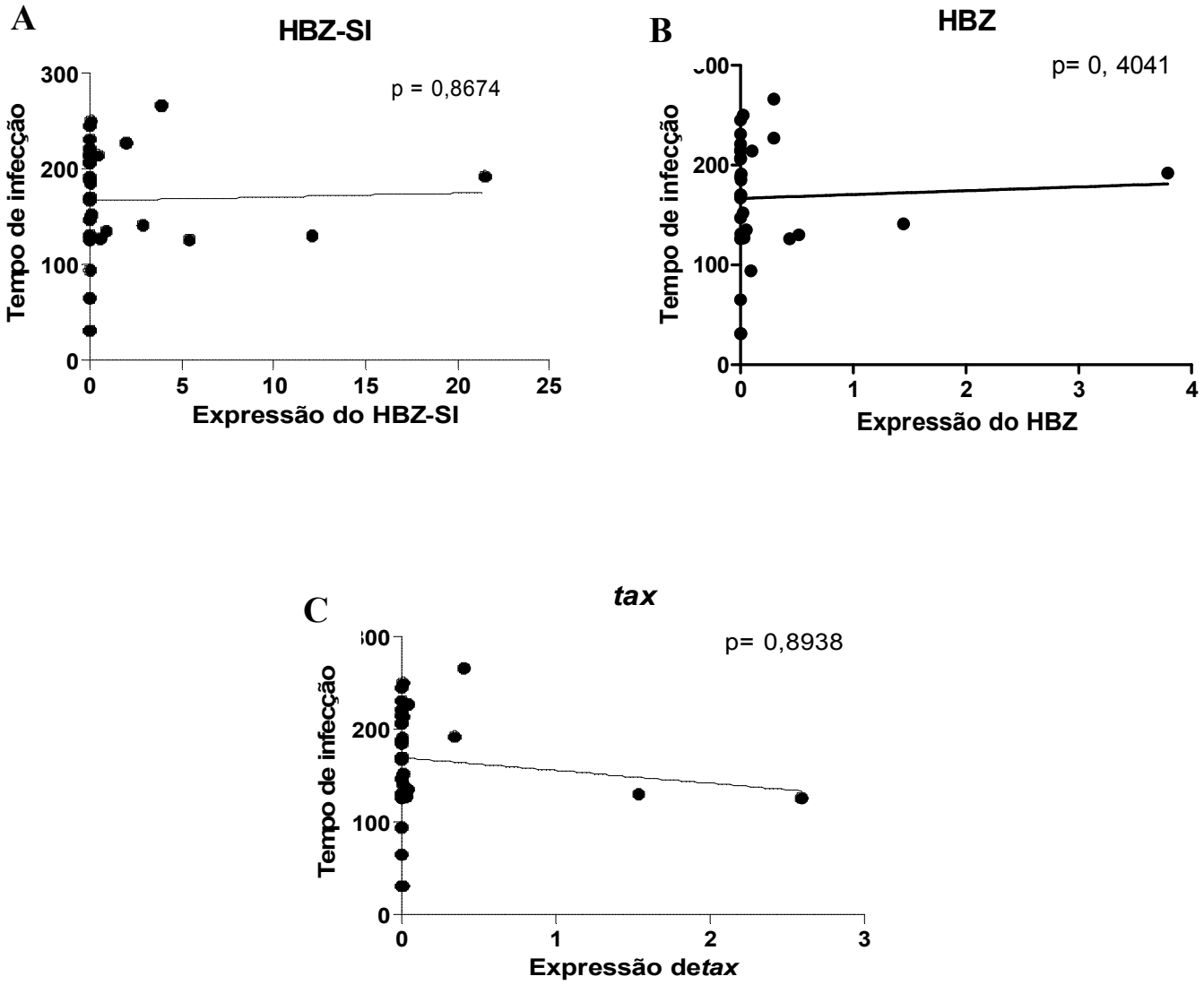

Figura 15: Correlação da expressão dos genes virais com o tempo de infecção.Valores ajustados pelos valores de expressão do gene que codifica para *β2-microglobulina* e pela carga proviral.HBZ-SI(A), HBZ(B) e *tax*(C).

5.3.2 Relação entre a manifestação de HAM/TSP nos pacientes de DIH e a expressão dos genes *HBZ* e *tax*.

Dos 32 pacientes de DIH incluídos no estudo 10 (31%) manifestaram também a forma infanto-juvenil de HAM/TSP. Observou-se maior expressão do transcrito HBZ-SI no grupo de pacientes que manifestam DIH e HAM/TSP (mediana 101,00, 6,29-264,35) que no grupo que manifestaram somente DIH (mediana 52,29, intervalo 2,42-171,57, p= 0,048, Mann Whitney test). Esta diferença estatisticamente significante perde-se quando os valores são ajustados pela expressão do gene que codifica para a *β2-microglobulina* e pela carga proviral. Não foi observada diferença na expressão do transcrito HBZ e do gene *tax* entre estes dois grupos. (Figura 16)

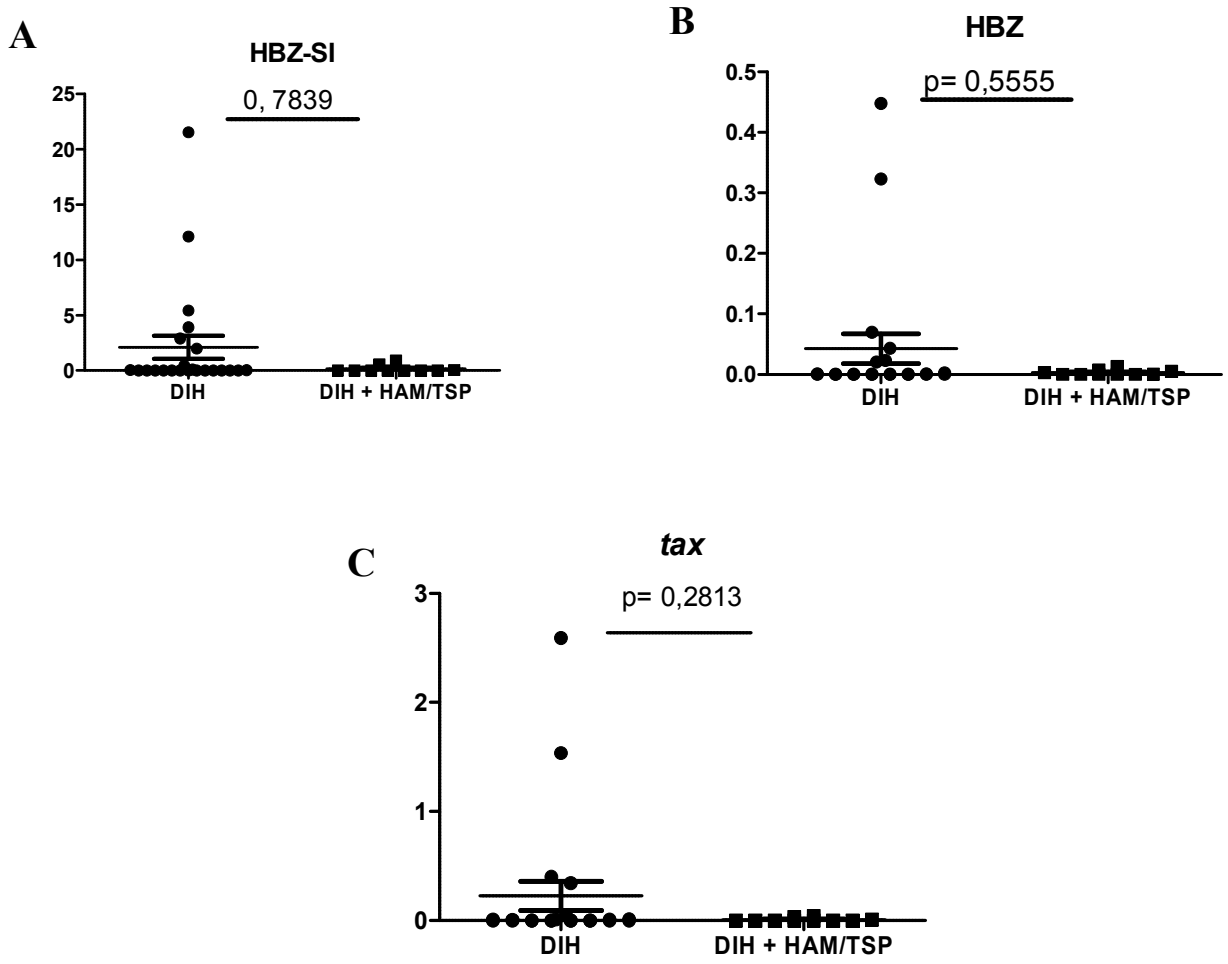

Figura 16: Comparação da expressão de HBZ-SI em valores não ajustados (A), e ajustados (B) no grupo de pacientes de DIH e no grupo de pacientes de DIH que apresentaram associação com HAM/TSP.

5.3.3 Relação entre o tempo de doença e expressão dos genes *HBZ* e *tax*.

Foi correlacionado o tempo de doença com a expressão dos genes *HBZ* e *tax*. Foi considerado como tempo de doença o período entre a data de diagnóstico e a data de coleta da amostra. A mediana do tempo de doença para o grupo de pacientes incluídos neste estudo foi de 146 (19-237 meses). Não foi observada correlação entre o tempo de doença e a expressão dos genes *HBZ* e *tax* para os dados de expressão não ajustados ou ajustados pela expressão do gene que codifica para a *β2-microglobulina* e pela carga proviral (Figura 17).

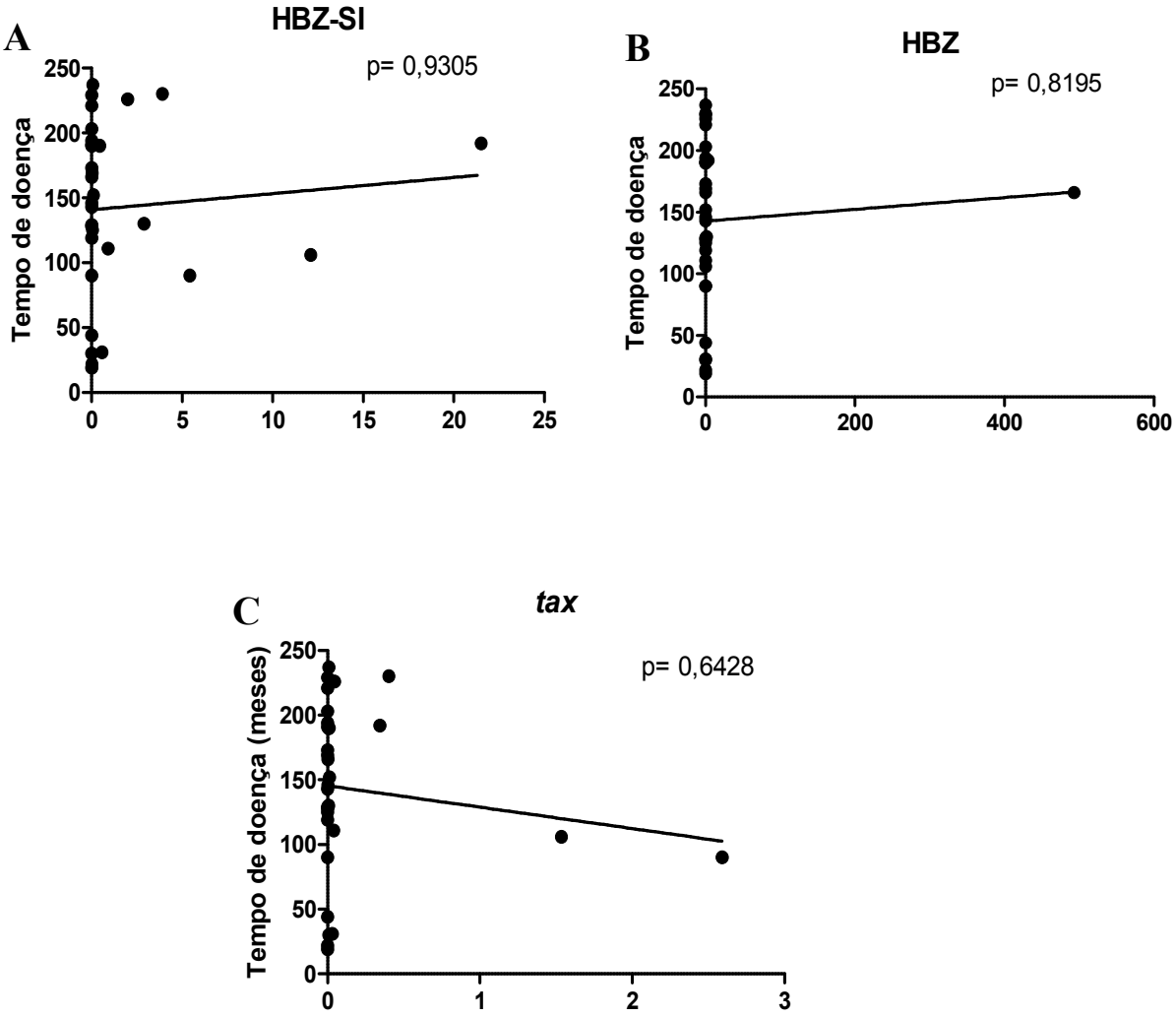

Figura 17: Correlação da expressão dos genes virais com o tempo de doença em meses.Valores ajustados pelos valores de expressão do gene que codifica para *β2-microglobulina* e pela carga proviral.HBZ-SI(A), HBZ(B) e *tax*(C). Valores expressos em número de cópias por 140ng de RNA total.

5.3.4 Relação entre a manifestação da DIH e a expressão dos genes *HBZ* e *tax*.

No momento da coleta, 10 dos pacientes de DIH incluídos encontravam-se em remissão. Foi comparada a expressão dos genes *tax* e *HBZ* entre o grupo de pacientes com doença em atividade e o grupo de pacientes em remissão e não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para a expressão destes genes (Figura 18), com p= 0, 5555 para a expressão do transcrito HBZ-SI nesses grupos, p= 0,4026 para o transcrito HBZ e p= 0, 9514 para o gene *tax,* em dados ajustados.

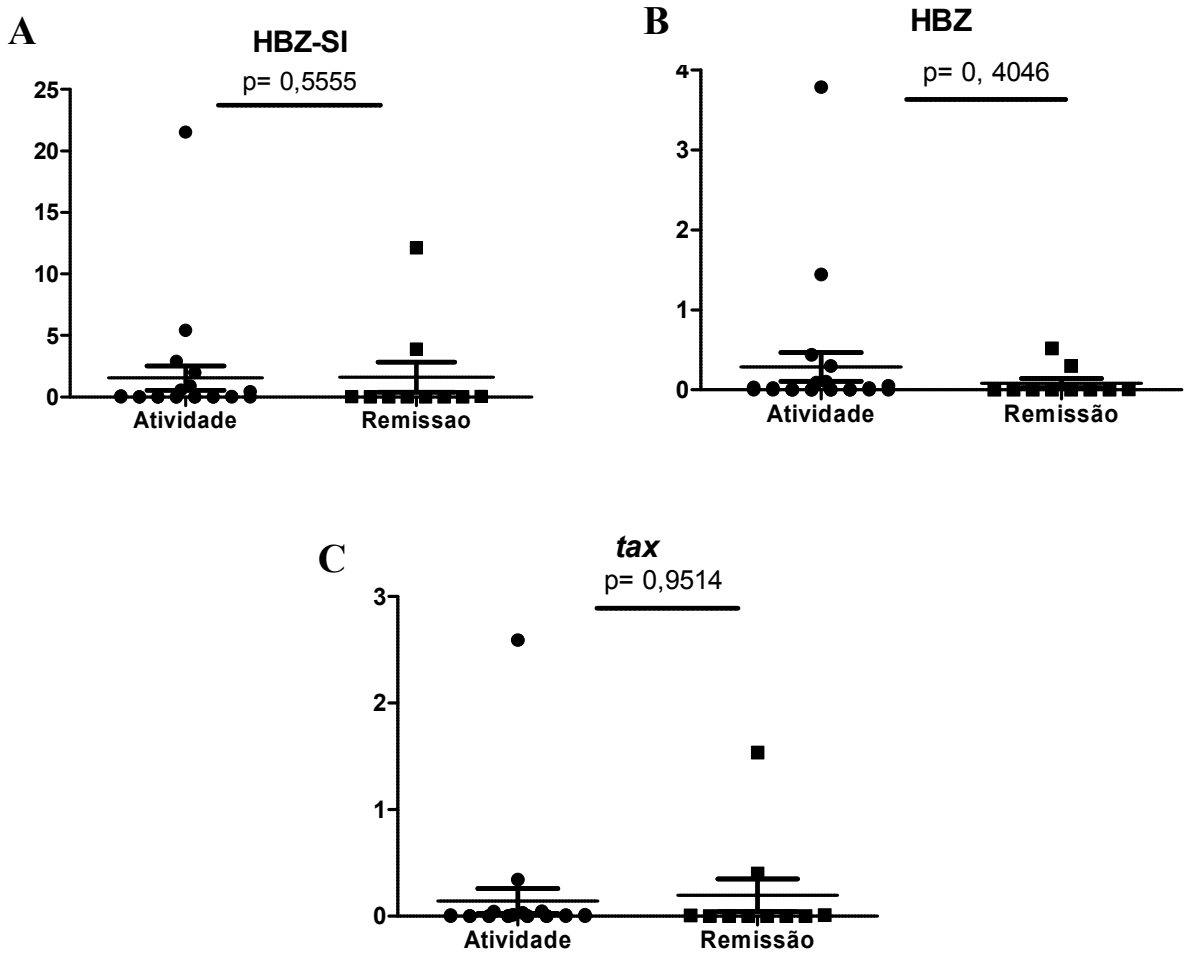

Figura 18: Correlação da expressão de HBZ-SI(A), HBZ(B) e *tax*(C) com a manifestação da doença. Valores ajustados pelos valores de expressão do gene que codifica para *β2-microglobulina* pela carga proviral.

5.3.5 Relação entre a presença de linfócitos atípicos no sangue periférico e a expressão dos genes *HBZ* e *tax*.

Cinco dos 32 pacientes incluídos apresentavam células em flor no esfregaço do sangue periférico no momento da coleta. A percentagem destas células variou de 1 a 5% dos linfócitos dependendo do paciente. A expressão dos genes *tax* e *HBZ* nestes pacientes foi comparada com a expressão destes genes nos pacientes sem linfócitos atípicos no sangue periférico (n= 27). Foram excluídos desta análise três pacientes que apresentaram linfócitos atípicos não células em flor. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na expressão destes genes nos dois grupos tanto em dados não ajustados como ajustados (Figura 19).

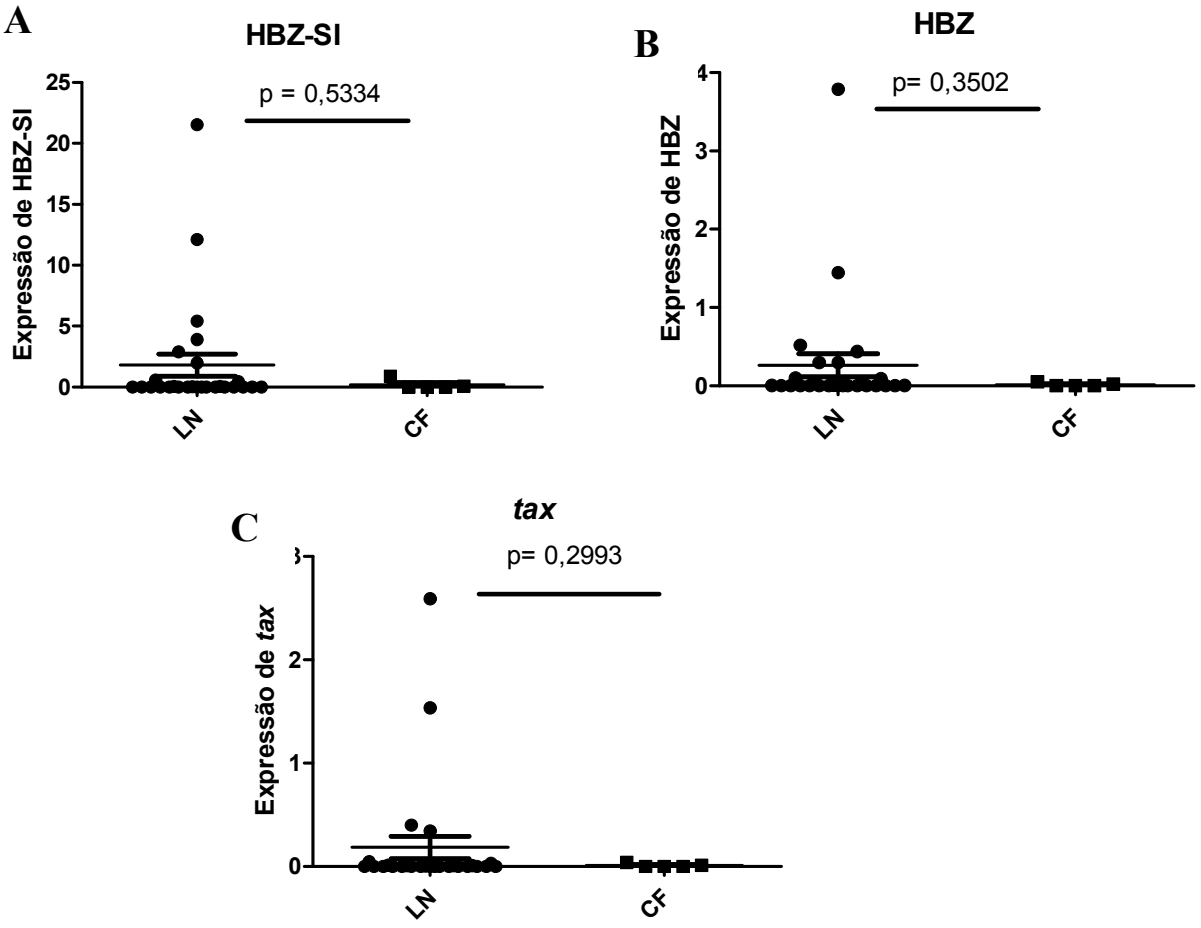

Figura 19: Correlação da expressão de HBZ-SI(A), HBZ(B) e *tax*(C) com a presença de linfócitos atípicos no sangue periférico. Valores normalizados pelos valores de expressão do gene que codifica para *β2-microglobulina* e normalizados pela carga proviral. LN: Grupo que apresenta linfócitos normais. CF: Grupo que apresenta célula-em-flor.

6. Discussão

Este estudo visa avaliar a expressão dos genes virais *HBZ* e *tax* em portadores do HTLV-1 na faixa infanto-juvenil. Incluiu-se pacientes de DIH e portadores assintomáticos. Os trabalhos disponíveis na literatura que estudam a expressão desses genes virais referem-se a portadores do HTLV-1 adultos e incluem portadores assintomáticos, pacientes com HAM/TSP (Saito *et al*, 2009), ATL e linhagens celulares infectadas com o HTLV-I (Usui *et al*., 2009; Kamihira *et al*., 2008). Neste sentido, este trabalho é inédito e vai contribuir no entendimento dos mecanismos de patogênese do HTLV-1 nas etapas inicias após infecção.

A proteína viral Tax vem sendo apontada na literatura como a principal responsável pela patogenicidade do HTLV-1 por induzir a proliferação e inibir a apoptose das células infectadas. Vários estudos realizados principalmente em modelos *in vitro* mostraram as diferentes ações pleiotrópicas desta proteína que tem capacidade de regular tanto a expressão viral como moléculas da célula hospedeira (Matsuoka e Jeang, 2007). Porém, estudos recentes mostraram que a expressão do gene *tax ex vivo*, em células procedentes de pacientes de ATL, HAM/TSP e portadores assintomáticos adultos é quase inexistente, o que levou a pergunta de em que fase este gene se expressa e qual é o verdadeiro papel deste na infecção pelo HTLV-1. Os nossos dados mostram que nos portadores na faixa infanto-juvenil, a expressão do gene *tax* também é baixa, porém mais freqüente quando comparada com os portadores adultos. Considerando que a proteína Tax é um dos principais alvos imunogênicos para as células T CD8+ específicas para o HTLV-1, a baixa ou inexistente expressão do gene *tax* foi interpretada na literatura como um mecanismo do vírus para escapar da ação do sistema imune do hospedeiro. Nesta interpretação pressupõe-se que em algumas etapas anteriores este gene foi altamente expresso, o que não foi ainda demonstrado *ex vivo*. A maior freqüência de expressão do gene *tax* nos portadores na faixa infanto-juvenil (tanto nos pacientes de DIH como nos portadores assintomáticos) pode estar relacionada com um menor tempo de convivência entre o vírus (menor tempo de infecção) e o hospedeiro, caracterizando uma fase inicial onde o sistema imune do hospedeiro não exerce muita pressão sobre o vírus. Para esclarecer melhor o papel de Tax nesta fase inicial da infecção estudos sobre a freqüência e funcionalidade de células $CD8^+$ na faixa infanto-juvenil podem contribuir. Na ATL, a expressão baixa ou inexistente do gene *tax* foi relacionada, dentre outros fatores, a hipermetilação ou deleção da região promotora

5`LTR no DNA proviral (Matsuoka & Jeang, 2007). Estudos neste sentido também contribuirão para esclarecer os mecanismos de regulação deste gene na faixa infanto-juvenil.

Com relação ao gene *HBZ*, os poucos estudos disponíveis na literatura mostraram que a maioria dos pacientes de ATL, HAM/TSP e portadores assintomáticos adultos expressam este gene, e em maiores níveis que os observados para o gene *tax* (Saito *et al*., 2009; Usui *et al*., 2008). No presente estudo, a expressão do gene *HBZ* também foi maior que a expressão do gene *tax* nos pacientes de DIH o que sugere que o gene *HBZ* tem um papel mais importante na patogênese da DIH que o gene *tax*, como parece ser para a ATL e HAM/TSP (Satou *et al*, 2006, Matsuoka and Green, 2009). O gene *HBZ* produz dois transcritos, o HBZ-SI e o HBZ (Murata *et al*., 2005; Gaudray *et al*., 2002). Os níveis de transcrição de cada um dos transcritos foi maior do que os níveis de transcrição do gene *tax*. Foi interessante observar que a expressão dos dois transcritos do gene *HBZ* correlacionou positivamente com a expressão do gene *tax* o que indica que aqueles pacientes que têm altos níveis de transcrição de *HBZ* também têm altos níveis de expressão de *tax*. Na literatura se sugere que a expressão do gene *HBZ* acontece para contra-restar a expressão e ações do gene *tax* e deste modo, seria esperado observar uma correlação negativa e não positiva. A proteína HBZ, e não o mRNA, tem capacidade de regular a transcrição viral mediada por Tax (Satou *et al*., 2006) através do promotor 5´LTR. Neste trabalho não realizamos avaliações em nível de proteína e planejamos realizá-las no futuro, pois essas análises serão de grande importância para entender melhor os mecanismos de regulação destes genes virais e seu papel na DIH. A proteína HBZ também interfere nas vias de transcrição da célula hospedeira, interagindo na via do NF-KB (Matsuoka *et al*., 2009) e regula fatores de transcrição humanos, entre eles, a família de Jun/Fos (Basbous *et al*., 2003).

Nos pacientes com ATL e HAM/TSP, o transcrito HBZ-SI é observado com mais freqüência e quantidade que o transcrito HBZ (Cavanagh *et al*., 2006, Usui *et al*., 2008; Saito *et al*., 2009). Este dado também foi observado no nosso estudo para os pacientes com DIH considerando os dados não ajustados. Na literatura, recentes trabalhos realizados em modelos *in vitro* mostram que o transcrito HBZ-SI tem maior capacidade de induzir proliferação celular e produz níveis maiores de proteína (Murata *et al*., 2005). Porém, esta diferença não foi observada nos dados ajustados pela expressão da *β2-microglobulina*. O ajuste dos dados pela expressão de um gene constitutivo humano é adotado somente na metodologia de alguns trabalhos que

quantificam estes genes virais. Por isto, neste estudo consideramos para análise os valores obtidos da reação de quantificação e os valores ajustados pela expressão do gene da *β2-microglobulina*. Este ajuste pode ser discutido sendo que a amostra de partida de PBMC para a obtenção do RNA estava composta de células não infectadas (população majoritária) e células infectadas (população minoritária). Deste modo, a expressão deste gene humano refere-se a todas as células da amostra enquanto os valores da expressão dos genes virais referem-se unicamente as células infectadas. Metodologicamente consideramos que seria mais adequado ajustar os valores obtidos para os genes virais com o valor da expressão do gene humano constitutivo referente unicamente das células infectadas, o que não foi possível. A proporção entre as duas populações variou muito de paciente para paciente, como foi observado pela variação da carga proviral. Também observamos níveis mais elevados de expressão do gene da *β2-microglobulina* nos pacientes de DIH quando comparados com os portadores assintomáticos ($p=0.042$, teste de Mann-Whitney), que não atribuímos a quantidade ou qualidade do RNA, pois a qualidade do RNA obtido nas amostras dos portadores assintomáticos foi boa e similar à obtida para os pacientes de DIH e a quantificação de todas as amostras de RNA (portadores assintomáticos e pacientes de DIH) foi realizada conjuntamente. A reação de transcrição reversa também foi realizada com os mesmos reagentes e nas mesmas condições.

Optamos por utilizar oligos específicos para cada um dos genes estudados (virais, *tax* e *HBZ* e humano, *β2-microglobulina*) para a obtenção dos cDNAs e realizar uma única reação de transcrição reversa, pois consideramos esta estratégia uma melhor aproximação a respeito da utilizada por Usui e col., 2008 para ATL, onde foram utilizados oligos inespecíficos para ao gene *tax* e o controle constitutivo e oligos específicos para os dois transcritos do gene *HBZ*, para o que foi preciso duas reações diferentes para obtenção dos cDNAs. Nesse trabalho, os autores ajustaram somente os valores de expressão do gene *tax* com o controle constitutivo humano e os comparam com os valores de expressão do gene HBZ não ajustados. Na quantificação destes genes para a HAM/TSP e ATL realizada por Saito e col., 2009, os autores utilizaram hexameros randômicos como oligos em uma única reação. Porém precisaram partir de grande quantidade de RNA e não consideraram que o gene *HBZ* compartilha seqüências gênicas com outros genes virais (Figura 4) que se transcrevem em sentido sense, podendo amplificar produtos destes genes de maneira inespecífica. Em experimentos preliminares, quantificamos a expressão de *tax* partindo do cDNA produzido utilizando

oligos inespecíficos e obtivemos níveis de expressão muito menores quando comprados com os obtidos utilizando oligos específicos, para as mesmas amostras e a mesma quantidade de RNA de partida, indicando que a metodologia adotada pode influenciar os resultados e precisa ser discutida.

Tanto a expressão do gene *tax* como a do gene *HBZ* foi maior nos pacientes de DIH a respeito dos portadores assintomáticos. Porém, esta diferença não foi observada nos valores ajustados da expressão destes genes. Como comentado, a quantificação do gene da *β2-microglobulina* foi estatisticamente maior nos pacientes quando comparada com os assintomáticos. Este foi um dado inesperado que ao ser utilizado para ajustar os valores de quantificação dos genes virais, pode afetar os resultados.

Nos portadores assintomáticos os níveis de expressão do HBZ-SI e do HBZ foram similares, diferentemente do observado para os pacientes de DIH. Uma expressão mais elevada do transcrito HBZ-SI na DIH poderia contribuir para a alta carga proviral observada nestes pacientes quando comparada com os assintomáticos.

Usui e col, 2008, observaram nos pacientes de ATL uma correlação positiva entre a carga proviral e a expressão do gene *HBZ* (HBZ-SI mRNA). Nesse caso, a expressão do transcrito HBZ-SI aumentava com o número de células infectadas. Nossos resultados não evidenciaram correlação entre a carga proviral e a expressão dos genes *tax* e *HBZ* o que sugere que a expressão aumentada dos genes não está relacionada com a quantidade de células infectadas na amostra, mas com algum mecanismo de regulação da expressão destes genes associado à alguma função dos transcritos.

Alguns autores descreveram que a DIH pode desenvolver para ATL (Tsukasaki *et al*., 1994) e HAM/TSP (Araújo *et al*., 2002). Dez dos 32 pacientes incluídos neste estudo manifestavam simultaneamente HAM/TSP (Primo *et al*., 2005). Quando comparados estes dois grupos foi observada maior expressão do transcrito HBZ-SI do gene *HBZ* nos pacientes com DIH e HAM/TSP. Porém, esta diferença não se manteve quando foram considerados os valores ajustados. Nos pacientes de HAM/TSP adultos os altos níveis de expressão do gene *HBZ* foram relacionados com alta carga proviral (Saito *et al*., 2009). A carga proviral entre o grupo de DIH e o grupo de DIH e HAM/TSP foi similar.

Não foi observada associação entre a expressão dos genes *HBZ* e *tax* e o tempo de infecção, tempo de doença e a remissão das manifestações clinicas para os pacientes de DIH. Outros aspectos da clínica destes pacientes precisam ser avaliados e relacionados com a regulação destes genes. Os mecanismos de patogênese da DIH ainda

não foram bem esclarecidos. Recentes dados mostram que estes pacientes apresentam alta carga proviral e que, no PBMC, produzem níveis mais elevados de IFN-γ e TNF-α quando comparados com portadores assintomáticos, caracterizando uma proliferação aumentada de células infectadas relacionada a uma resposta exacerbada de tipo I. Sendo que a expressão dos genes tax e HBZ encontra-se aumentada nos pacientes de DIH a respeito dos assintomáticos, os produtos destes genes poderiam estar contribuindo a aumentar o numero de células infectadas o que provocaria uma resposta inflamatória. Abordagens de análise em redes fazem-se necessários para poder considerar os possíveis múltiplos fatores envolvidos na patogênese da DIH e poder estabelecer inter-relações de causa e efeito.

A presença de células-em-flor no sangue periférico é uma característica dos pacientes com ATL (Tsukasaki *et al*., 2009), ocorrendo com mais freqüência em casos agudos e podendo ser detectadas em casos smoldering e crônicos (Shimoyama *et al.*, 1991). No nosso estudo, cinco pacientes de DIH já apresentavam células-em-flor no sangue periférico em percentagens que variaram de 1 a 5% no momento da coleta. Estes pacientes consideram-se como casos pré-ATL, ou seja, casos de DIH que tem maior risco de evoluir para ATL (Oliveira *et al*., 2010). Quando comparados o grupo de pacientes com células-em-flor com o grupo de pacientes sem linfócitos atípicos no sangue periférico não foram observadas diferenças nos níveis de transcrição dos genes *tax* e *HBZ*. O número de pacientes nestes dois grupos foi pequeno, porém pode-se sugerir que a expressão destes genes virais não estaria relacionada com a presença de células-em-flor. Seria muito interessante poder avaliar a expressão destes genes nas células-em-flor nestes pacientes. Metodologicamente esta abordagem torna-se complexa pela pequena percentagem destas células no PBMC. Esta avaliação será mais fatível na ATL onde estas células são mais freqüentes. O nosso grupo esta iniciando o estudo destes genes virais nas diferentes formas clinicas da ATL.

No grupo de pacientes com DIH no presente estudo incluiu 21 indivíduos do sexo feminino e 10 do sexo masculino. Esta maior proporção de pacientes do sexo feminino está de acordo com os dados da literatura que mostram uma maior prevalência dessa patologia em portadoras do sexo feminino (Manns *et al*., 1999). O número de portadores assintomáticos incluídos no presente estudo é pequeno e pretendemos aumentá-lo antes da submissão destes resultados para publicação.

Até o momento não existe terapia eficaz para o tratamento da DIH. Como a DIH se associa a infecção bacteriana, os pacientes são tratados com sulfametoxazol associado a trimetoprim, recidivando quando a medicação é suspensa. A DIH pode evoluir para HAM/TSP e ATL (Oliveira *et al*., 2005; Hanchard *et al*., 1991; Primo *et al*., 2005). Não se conhecem os fatores envolvidos nesta evolução e também não existem estratégias terapêuticas que possam freá-la. O conhecimento dos mecanismos patogênicos da DIH é de extrema importância para a identificação de marcadores moleculares de manifestação e evolução assim como de novos alvos terapêuticos para o desenho de terapias racionais. O aprofundamento no estudo do papel destes genes virais na DIH pode contribuir neste sentido.

7. Conclusões

Pela primeira vez mostrou-se a expressão dos genes virais *HBZ* (HBZ-SI e HBZ) e *tax*, pôde ser observada em pacientes da faixa infanto-juvenil com DIH e em portadores assintomáticos da mesma faixa etária.

Os transcritos HBZ-SI e HBZ tiveram maiores níveis de expressão que o *tax* nos pacientes de DIH, enquanto que nos portadores assintomáticos apenas HBZ-SI apresenta maior nível de expressão que *tax.* Não houve correlação entre a expressão destes genes com a carga proviral e com os dados clínicos nos grupos de pacientes de DIH e portadores assintomáticos da faixa infanto-juvenil.

Tendo em vista todos os aspectos aqui demonstrados, pode-se concluir também que a expressão de *HBZ* e *tax*, não é restrita à pacientes de ATL e HAM/TSP e estudos de quantificação desses genes virais, bem como dos seus mecanismos de ação, podem contribuir para o estabelecimento de medidas que permitam melhorar a qualidade de vida dos indivíduos acometidos pelas patologias associadas ao HTLV-I em etapas iniciais da infecção.

8. Referências

ARAÚJO, A.P. *et al.,* Juvenile Human T Lymphotropic Virus Type I-Associated Myelopathy. **Clinical Infectious Diseases**, 2002; 35:201-4

ARISAWA, K. *et al*. Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan. **International Journal of Cancer**, v.85, n.3, p.319-324, 2000.

AQUIJE M, Ballona R. Dermatitis infectiva asociada a HTLV-I em el Servicio de Dermatología del instituto de la Salud del Niño. **Folia Dermatol Peruana**. 2002;13:1-8

BARBOSA, H. S. *et al*. Adult T-cell leukemia/lymphoma in northeastern Brazil: a clinical, histopathologic, and molecular study. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human,** v. 21, p. 65-71, 1999

BASBOUS, J. *et al*. The *HBZ* factor of human T-cell leukemia vírus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 43620-43627, 2003;

BITTERNCOURT, A. L. Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Bahia, Brazil. **Brazillian Journal of Infectious Disease**. 2005; 9:437-8.

BITTENCOURT, A. L, Primo J, de Oliveira MF. Manifestations of the human T-cell lymphotropic virus type I infection in childhood and adolescence. **Jornal de Pediatria** (Rio J). 2006;82:411-20;

BITTENCOURT, A. L. *et al*. Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Bahia, Brazil: analysis of prognostic factors in a group of 70 patients. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 128, p. 875-882, 2007;

BITTENCOURT, A. L. ; FARRE, L. Leucemia/linfoma de células T do adulto. **Revista Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 8, p. 351-359, 2008;

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. *et al*. Vertical transmission og HTLV-I/II: a review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, p. 245-251, 1998;

CATALAN-SOARES, Bernadette Corrêa; PROIETTI, Fernando Augusto and CARNEIRO-PROIETTI, Anna Bárbara de Freitas. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000): aspectos epidemiológicos. **Revista brasileira de epidemiologia**. 2001, vol.4, n.2, pp. 81-95.

CATALAN-SOARES, B. C.; CARNEIRO-PROIEITTI A. B. F.; PROIETTI F. A.. Heterogenous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood from large urban áreas in Brazil. **Cadernos de Saúde Publica**, v. 21, n. 3, p. 926-931, 2005;

CATALAN-SOARES , B. C.; PROIETTI, F. A. HTLV-I E II: aspectos epidemiológicos. **Cadernos Hemominas**, v. 13, p. 69-85, 2006;

CAVANAGH, MH, *et al*., HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3'LTR are alternatively spliced and polyadenylated. **Retrovirology**, 2006

DOI, K. *et al*. Preferential selection of human T-cell vírus type I provirus integration sites in leukemic versus carrier states. **Blood**, Washington, v. 106, n. 3, p.1048-1053, 2005;

DOURADO, I. *et al*. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 34, n. 5, p. 527-531, 2003;

FARRE, L. *et al.* Early sequential Development of Infective Dermatitis, Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1- Associated Myelopathy, and Adult T Cell Leukemia/Lymphoma. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, p.440-442, 2008

GAUDRAY, G. *et al*. The complementary strand of the human T-cell leukemia vírus type I RNA genomes encodes a bzip transcription factor that down-regulates viral transcription. **The Journal of Virology**, v. 76, p. 12813-12822, 2002;

GONÇALVES, D. U. *et al*. HTLV-I associated infective dermatitis may be an indolent HTLV-I associated lymphoma. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 4, p. 100-102, 2000;

GRASSMANN, R, *et al*, Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-I Tax. **Oncogene**, 2005;

HANCHARD, B. *et al*. Childhood infective dermatitis evolving into adult T-cell leukemia after 17 years**. The Lancet**, v. 338, p. 1593-1594, 1991;

HIVIN, P. *et al*. Nuclear localization of HTLV-I bZIP factor (*HBZ*) is mediated by three distinct motifs. **Journal of Cell Science**, v. 118, p. 1355-1362, 2005;

JEFFERY, K. J. *et al*. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus - I (HTLV-I) proviral load and the risk of HTLV-I associated myelopathy. **Proceedings of National Academy of Sciences**, v. 96, p. 3848-3853, 1999.

KAMIHIRA, S. *et al.* A novel alternative splicing isoform of human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ-SI) targets distinct subnuclear localization. **Journal of Virology**, v. 80, p. 2495-2505, 2006

KAMIHIRA, S. *et al*. Characteristic expression of HTLV-I basic zipper factor (*HBZ*) transcripts in HTLV-I provirus-positive cells. **Retrovirology,** 2008;

KANNAGI, M. *et al*. Predominat recognition of human T cell leukemia vírus type I (HTLV-I) pX gene products by human $CD8^+$ cytotoxic T cells directed against HTLV-I –infected cells. **International Immunology**, v.3, n.8, p. 761-767, 1991;

KIRA, J. *et al*. Increased human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I proviral DNA in human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I associated myelopathy: a quantitative polymerase chain reaction study. **Annals of Neurology**, v. 29, p. 194-201, 1991.

LA GRENADE L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **The Lancet**. 1990; 336:1345-7;

LA GRENADE, L. *et al*. Tropical spastic paraparesis occurring in HTLV-I associated infective dermatitis. Report of two cases. **West Indian Medical Journal**, v. 44, p. 34-35, 1995;

LA GRENADE L, Manns A, Fletcher V, Carberry C, Hanchard B, Maloney E, Cranston B, Williams NP, Wilks R, Kang EC, Blattner WA. Clinical, Pathologic, and immunologic features of human T-lymphotropic vírus type I-associated infective dermatitis in children. **Archives of Dermatology** 134: 439-444, 1998;

LAMBERTUCI, J. R, *et al*, Lesões dermatológicas em pacientes infectados pelo vírus linfotrópico humano de células T do tipo I (HTLV-I). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2005;

MAHÉ A, Meertens L, Ly F, Sow PS, Diop CT, Samb ND, et al. Human T-cell leukaemia/lymphoma virus type 1-associated infective dermatitis in Africa: a report of five cases from Senegal**. British Journal of Dermatology** 2004; 150:958-65.

MALONEY E. M, Hisada M, Palmer P, Brooks K, Pate E, Wiktor SZ, et al. Human T cell lymphotropic virus type I-associated infective dermatitis in Jamaica: A case report of clinical and biologic correlates. **Pediatric Infecti Disease Journal.** 2000;19:456-61

MANNS, A.; HISADA, M.; LA GRENADE, L. Human T-lymphotropic vírus type I infection. **The Lancet**, v. 353, n. 9168, p. 1951-1958, 1999;

MATSUMOTO, J. *et al*. HTLV-I *HBZ* suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein. **Oncogene**, v. 24, p. 1001-1010, 2005;

MATSUOKA, M. Human T-cell, leukemia vírus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology**, v. 2, n. 27, 2005;

MATSUOKA, M. & JEANG, K.T. Human T-cell leukemia vírus type I (HTLV-I) infectivity and celular transformation. **Nature Reviews Câncer**, v. 7, p. 270-280, 2007;

MATSUOKA, M & GREEN, P. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. **Retrovirology**, 2009

MATSUOKA, M., *et al*., Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively supress the classical pathway of NF-k. **Blood,** 2009

MESNARD, J-M.; BARBEAU, B.; DEVAUX, C. *HBZ*, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia. **Blood**, v. 108, n. 13, p. 3979-3982, 2006;

MIYAZAKI, M. *et al*. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. **Journal of Virology**, v. 81, n. 11, p. 5714-5723, 2007;

MORENO-CARVALHO, O. A. *et al*. Evidence of preferential female prevalence of HTLV-I associated tropical spastic paraparesis in Bahia-Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 50, p. 183-188, 1992.

MURATA, K, *et al*., A novel alternative splicing isoform of human T-cell Leukemia Virus Type 1 bZIP Factor (HBZ-SI) Targets Distinct Subnuclear Localization. **Journal of Virology**. V. 80, p. 2495-2505, 2005

NAKAGAWA, M. HTLV-I associated myelopathy: analysis of 213 patients base don clinical features and laboratory findings. **Journal of NeuroVirology**, v. 1, p. 50-61, 1995;

NASCIMENTO M.C, Primo J, Bittencourt A, Siqueira I, de Fátima Oliveira M, Meyer R, Schriefer A, Santos SB, Carvalho EM. Infective dermatitis has similar immunological features to human T lymphotropic virus-type 1-associatedmyelopathy/tropical spastic paraparesis. **Clin Exp Immunol.** 2009;

NEUVEUT, C *et al*. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax and cell cycle progression: role of ciclin D-cdk and p110Rb. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, p. 32-36, 1998;

OLIVEIRA, M. F. P. *et al*. Infective dermatitis associated with the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Salvador, Bahia, Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 11, p. 90-96, 2005 ;

OLIVEIRA, M. F. P. *et al*. Flower cells in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. **Journal of Clinical Virology**, 2010;

ORLAND, J. R. *et al*. Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV outcomes study. **Neurology**, v. 61, p. 1588-1594, 2003:

OSAME, M. *et al*. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **The Lancet**, 1986;

POIESZ, B. ET AL. Detection and isolation of type C retrovírus particles from fresh blood and cultured lymphocytes of a patient a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n.12, p. 7415-7419, 1980;

POZZATTI, R., J. Vogel, and G. Jay. 1990. The human T-lymphotropic virus type I tax gene can cooperate with the ras oncogene to induce neoplasic transformation of cells. **Mol. Cell. Biol**. 10:413-417;

PRIMO, J. R. *et al*. Infective dermatitis and juvenile HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 535-541, 2005;

PRIMO J, Siqueira I, Nascimento MC, Oliveira MF, Farre L, Carvalho EM, Bittencourt AL. High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. **Braz J Med Biol Res.** 2009:

PROIETTI, J. R. ET AL. Infective dermatitis and juvenile HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p. 535-541, 2005;

ROMANOS, M.T.V.; SANTOS, N.S.O.; MIRANDA, M.M.F.S. Viroses oncogênicas. Introdução à virologia humana. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p. 199-204, 2000;

SAITO M, Matsuzaki T, Satou Y, Yasunaga J, Saito K, Arimura K, Matsuoka M, Ohara Y. In vivo expression of the *HBZ* gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associatedmyelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Retrovirology.** 2009:

SANTOS, F. L. N. *et al*. Epidemiologia, fisiopatogenia e diganóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. **J. Brás. Patol. Med. Lab**. v. 41, n. 2. p. 105-16, 2005;

SANTOS, J. I. *et al.* Seroprevalence of HIV, HTLV-I/II and other perinatally-transmitted pathogens in Salvador, Bahia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 4, p. 343-348, 1995;

SATOU, Y. *et al*. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 3, p. 720-725, 2006;

SATOU, Y and MATSUOKA, M. Implication of the *HTLV- I bZIP Factor* Gene in the Leukemogenesis of Adult T-Cell Leukemia. **International Journal of Hematolgy**. v.86, p. 107-112, 2007;

SCHMITT, I. *et al*. Stimulation of cyclin-dependent kinase activity and G1-to S-phase transition in human lymphotropic virus type 1 Tax protein. **The Journal of Virolology**, v. 72, p. 633-640, 1998;

SHIMOYAMA, M. *et al*. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. **British Journal of Hematology**, v.79, n.3, p. 428-437, 1991

SMITH, M.R, *et al*., Type I human T cell leukemia virus tax protein transforms rat fibroblasts through the cyclic adenosine monophosphate response element binding protein/activating transcription factor pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, p. 1038-1042, 1991;

SOARES, B. C. C.; CASTRO, M. S. M.; PROIETTI, F. A. Epidemiologia do HTLV-I/II. **Cardenos Hemominas**, v. 11, p. 53-75, 2000

SUITE M, Jack N, Basdeo-Maharaj K, Edwards J, White F, Blattner W, et al. Infective dermatitis in Trinidad and Tobago. **Aids Res Hum Retroviruses**. 1994;10:447

SWEET RD. A pattern of eczema in Jamaica. **British Journal of Dermatology**. V. 78, p. 93-100, 1966

TAYLOR, G.P.; MATSUOKA, M. Natural history of adulto T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6047-6057, 2005;

THEBAULT, S. *et al*. *HBZ* interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. **FEBS Letters**, v. 562, p. 165-170, 2004;

TSUKASAKI, K. *et al*. Infective dermatitis among patients with ATL in Japan. **International Journal of Cancer,** v. 57, p. 293, 1994;

TSUKASAKI, K. *et al*., Definition, Prognostic Factors, Treatment, and Response Criteria of Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma: A Proposal From an International Consensus Meeting. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, p 453-459, 2009

USUI, T. *et al*. Characteristic expression of *HTLV-I basic zipper factor* (*HBZ*) transcripts in HTLV-I provirus-positive cells. **Retrovirology**, v. 5, n. 34, p. 1-11, 2008.

YOSHIDA, M. *et al*. Monoclonal integration of human T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia suggest causative role of human T-cell leukemia vírus in the disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 2534-2537, 1984;

YOSHIDA, M. Multiple Viral Strategies of HTLV-1 for Dysregulation of Cell Growth Control. **Annu. Rev. Immunol**. 2001, 19:475-96