

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

**Modulação de genes e proteínas virais e da via NFκB pelo 17β-estradiol
em linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1(*Human T-lymphotropic
virus 1*)**

LUCIANA DEBORTOLI DE CARVALHO

Orientadora: Prof (a) Dra Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Co-Orientadora: Dra Marina Lobato Martins

BELO HORIZONTE

2012

Luciana Debortoli de Carvalho

**Modulação de genes e proteínas virais e da via NF κ B pelo 17 β -estradiol
em linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1(*Human T-lymphotropic
virus 1*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BELO HORIZONTE

2012

“Para viver de verdade, pensando e repensando a existência, para que ela valha à pena, é preciso ser amado; e amar; e amar-se. Ter esperança; qualquer esperança. Questionar o que nos é imposto, sem rebeldias insensatas, mas sem demasiada sensatez. Saborear o bom, mas aqui e ali enfrentar o ruim. Suportar sem se submeter, aceitar sem se humilhar, entregar-se sem renunciar a si mesmo e à possível dignidade. Sonhar, porque se desistimos disso apaga-se a última claridade e nada mais valerá a pena. Escapar, na liberdade do pensamento, desse espírito de manada que trabalha obstinadamente para nos enquadrar, seja lá no que for. E que o mínimo que a gente faça seja, a cada momento, o melhor que afinal se conseguiu fazer.” Lya Luft.

Agradecimento

A Deus, pela minha vida, saúde, minha determinação e crenças espirituais.

Aos meus pais, Dalton e Lêda, o mais profundo agradecimento por suas sábias lições de esperança; sempre repetindo palavras essenciais – como, por exemplo: amor, compreensão, persistência e alegria – infundiram-me a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

As minhas irmãs Eliane, Valéria e Ana Paula e aos meus sobrinhos Pedro e Rafael pelo carinho e apoio incondicional em todos os momentos.

A minha orientadora, Prof. Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, pelo entusiasmo contagiante, pela orientação precisa e oportunidade de transformar este meu sonho em realidade.

A minha co-orientadora, Marina Lobato, pela calorosa recepção, pela disponibilidade em nos ajudar, pela lição de humildade e competência.

À Camila, companheira, amiga inseparável, com quem tenho aprendido bastante. Obrigada de coração, por me apresentar o mundo da pesquisa acadêmica, a me ensinar as técnicas e por me incentivar com doces palavras!

À Rafaela, que, além de amiga e companheira, muito me ensinou sobre as técnicas de biologia molecular e por me ajudar nas dificuldades da vida. Muito obrigada pelo sorriso, pela firmeza nos ensinamentos e carinho!

A Jaqueline e ao Rodrigo, que sempre procurou me ajudar no desenvolvimento dos experimentos e pela agradável companhia. Aos demais colegas do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada pelo convívio.

Aos meus amigos e professores do DPMI/UFJF: Vânia, Cláudio, Rosângela, Márcio e Luzia pelo incentivo, carinho, ensinamentos e torcida pelo meu sucesso.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao CNPq e à FAPEMIG, agências que apoiaram este projeto com recursos financeiros e bolsa de doutoramento.

RESUMO

O HTLV-1 foi o primeiro retrovírus a ser isolado em seres humanos e pode induzir Leucemia-Linfoma de células T (ATL) e mielopatia associada ao HTLV (HAM/TSP). O HTLV-1 pode ser transmitido por amamentação, durante relações sexuais e através de transfusões de sangue ou compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas. A transmissão do HTLV-1 é mais efetiva do homem para a mulher e mulheres infectadas adoecem mais do que os homens. Uma maior susceptibilidade feminina para a HAM/TSP é relatada em diferentes populações mundiais, mas sua causa não está esclarecida, sendo que estudos recentes apontam para um fator possivelmente hormonal. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a regulação pelo 17β estradiol de genes e proteínas virais, e da via NF κ B em linhagens linfocíticas humanas permanentemente infectadas e não infectadas pelo HTLV-1. As células foram tratadas com concentrações variáveis de 17β estradiol ($1\mu\text{M}$ a $0,0001\mu\text{M}$). A viabilidade celular foi avaliada pela técnica de citometria de fluxo (HFS), não sendo o hormônio sido citotóxico nas concentrações avaliadas. Para avaliação da expressão de genes virais, foi utilizada a PCR em tempo real. Houve alteração da expressão dos genes virais *gag/pol*, *tax/rex* (que codificam para proteínas estruturais, polimerase viral e proteínas regulatórias, respectivamente), especialmente na concentração de $0,01\mu\text{M}$ com redução na expressão dos genes avaliados, enquanto que para a concentração de $1\mu\text{M}$ da droga observou-se aumento na expressão destes genes, evidenciando uma regulação concentração-dependente. Foi avaliada a expressão da proteína Tax em células MT-2 submetidas ao tratamento com o 17β -estradiol ($1\mu\text{M}$ à $0,0001\mu\text{M}$ - Sigma) utilizando anticorpo monoclonal anti-Tax tendo esta também sido concentração-dependente e inversamente proporcional à concentração utilizada. A regulação da expressão da via NF κ B por PCR *array* foi avaliada para um conjunto de 84 genes, pós-tratamento com 17β -estradiol nas concentrações de $1\mu\text{M}$ e $0,01\mu\text{M}$ em células C91PL (células TCD4+/CD25+ / HTLV-1 positivas) e células Jurkat (células TCD4+/CD25+ /HTLV-1 negativas). Quinze genes foram regulados, sendo 11 (73%) de maneira concentração-dependente, em sua maioria regulada negativamente, contrariamente ao

observado nas células não infectadas. Os resultados obtidos sugerem que as flutuações nos níveis de estradiol podem alterar a expressão de proteínas e genes virais e importantes moléculas regulatórias da via NF κ B durante a infecção pelo HTLV-1, contribuindo para os processos de inflamação e cronificação observada em indivíduos infectados, especialmente no contexto da infecção em mulheres.