

RAFAELA GOMES ANDRADE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE *TAX* E *HBZ* E DE GENES CELULARES
RELACIONADOS COM A RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA EM
PORTADORES ASSINTOMÁTICOS E PACIENTES COM HAM/TSP COM
BAIXA OU ALTA CARGA PROVIRAL DO HTLV-1
(*Human T-lymphotropic vírus 1*)**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE
2012**

RAFAELA GOMES ANDRADE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE *TAX* E *HBZ* E DE GENES CELULARES
RELACIONADOS COM A RESPOSTA IMUNE INATA E ADAPTATIVA EM
PORTADORES ASSINTOMÁTICOS E PACIENTES COM HAM/TSP COM
BAIXA OU ALTA CARGA PROVIRAL DO HTLV-1**

(Human T-lymphotropic vírus 1)

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para o grau de Mestre. Este projeto foi desenvolvido na Fundação HEMOMINAS sendo parte integrante do GIPH (Grupo Interdisciplinar de Pesquisa em HTLV) e no Laboratório de Virologia Básica Aplicada, ICB, UFMG.

Orientadora: Marina Lobato Martins

Co-Orientadora: Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE

2012

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, por toda a sabedoria e oportunidades que me guiaram rumo a mais esta conquista e por sua presença cotidiana e amorosa.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e por abrir mãos de seus sonhos em favor dos meus. Pelo exemplo de força, de determinação, pelos valores que me ensinaram e apoio que me deram para ser hoje o que sou. Ao meu querido irmão Alexandre, pela presença amiga e apoio incondicional. Ao meu amor Thiago, pela compreensão, companheirismo, amor e presença durante todo esse período, que fizeram dos meus dias mais bonitos.

Aos meus familiares e amigos pelo apoio, torcida, paciência, amor e ajuda que me impulsionaram a seguir em frente com garra e determinação. Em especial à minha tia Ildicéia, pela presença infinita e almoços de fim de semana.

À Marina Lobato Martins, puro exemplo de amor à profissão e a vida, ensinou-me os caminhos do trabalho no dia-a-dia com ética, inteligência e brilhantismo. Agradeço a mão amiga que me guardaram e direcionaram nos momentos de aflição e que me acompanha por tantos anos. Obrigada pela confiança depositada em mim! Obrigada também a Professora Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, por acreditar no meu potencial e me propiciar essa oportunidade com todo o seu apoio!

Aos amigos do Laboratório de Pesquisa e da Fundação Hemominas, em especial a Regina Amarante e Poliane de Cássia Gonçalves, pela amizade, presença e companheirismo diários, que tanto me auxiliaram nesta caminhada. Obrigada às agências financiadoras FAPEMIG, CAPES e Fundação Hemominas, a todos os participantes do GIPH, a Dra. Anna Bárbara Freitas Carneiro Proietti, ao Dr. João Gabriel Ribas e, em especial aos pacientes, pela disposição em ajudar e assim, proporcionar a realização desse trabalho.

Aos novos amigos do Laboratório de Virologia Básica Aplicada pela amizade e companheirismo ao longo desse tempo. Obrigada em especial à Camila, pelo carinho e os momentos de alegria.

Aos professores e colegas da pós-graduação que me apoiaram e me ensinaram alguns dos caminhos da microbiologia e aos funcionários do programa, pelo carinho, presteza e dedicação.

RESUMO

Cerca de 5% das pessoas portadoras do HTLV-1 poderão desenvolver uma doença inflamatória degenerativa do sistema nervoso central conhecida como HAM/TSP (mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical). A carga proviral do HTLV-1 é um importante marcador de risco para doenças associadas ao vírus, visto que portadores sintomáticos têm em média níveis de carga proviral significativamente mais elevados que portadores assintomáticos. No entanto, há portadores assintomáticos (AC) com altos níveis de carga proviral, do mesmo modo que pacientes com HAM/TSP (HAM) com baixos níveis de carga proviral. Portanto, outros fatores são importantes no desfecho das doenças associadas ao HTLV-1. Foram avaliados os níveis de expressão do mRNA dos genes virais *tax* e *HBZ* e de 23 genes celulares envolvidos na resposta imune inata e adaptativa (TLR4, IL-12B, CD40, CD40L, CD80, CD86, CD28, perforina, granzima, FasL, Fas, IFN- γ , TNF- α , IL-8, IL-10, RANTES, CCR1, MIP-1 α , MCP-1, CCR2B, LFA-1, MMP-9 e *Foxp3*) em indivíduos AC e HAM classificados de acordo com o nível da carga proviral em baixa (L) ou alta (H), usando ensaios de RT-PCR em tempo real. Na avaliação da expressão dos mRNA de *tax* e de *sHBZ* foram analisadas amostras de 21 AC_L, 16 AC_H, 7 HAM_L e 19 HAM_H, e na avaliação da expressão dos mRNA dos genes celulares foram analisadas amostras de 14 AC_L, 9 AC_H, 7 HAM_L e 9 HAM_H, além de 14 doadores de sangue soronegativos (SN). Não houve diferença significativa na expressão do mRNA de *sHBZ* entre os subgrupos AC e HAM quando normalizado pela carga proviral. Em contraste, o mRNA de *tax* normalizado pela carga proviral foi significativamente maior no grupo HAM do que no grupo AC e em AC_H x AC_L, mas não foi observada diferença significativa entre os subgrupos HAM_L e HAM_H. Houve correlação positiva e significativa das expressões dos mRNA de ambos os genes virais com a carga proviral nos grupos AC e HAM, mas esta foi mais forte no grupo AC. O nível de expressão dos mRNA de *tax* e de *sHBZ* também foram correlacionados positivamente e significativamente nos grupos AC e HAM, porém esta foi mais forte no grupo HAM. Os dados mostraram que os indivíduos AC constituem um grupo mais heterogêneo do que o grupo HAM em relação à expressão dos mRNAs de *tax* e de *sHBZ*, e devem ser cuidadosamente avaliados quando

comparados com pacientes com HAM/TSP. Em conclusão, é importante avaliar os níveis dos mRNA de *tax* e de *sHBZ*, e não apenas da carga proviral, para melhor estimar o risco de desenvolvimento de HAM/TSP.

Em relação aos 23 genes celulares analisados, o grupo AC_L foi o que mostrou maior número de genes com expressão diferenciada do mRNA de no mínimo duas vezes em relação ao grupo SN, com diminuição do nível de TLR4 (-2.51x) e aumento do nível de IFN- γ (2.06x), IL-8 (3.6x) e CCL3 (2.63x). Os subgrupos AC_H e HAM_L apresentaram apenas um gene com expressão diminuída do mRNA em relação ao grupo SN (-2,29x de MIP-1 α e -3,37x de MMP-9, respectivamente). O grupo HAM_H não apresentou variação de pelo menos duas vezes em relação ao grupo SN para nenhum dos genes estudados. Houve diferença significativa na expressão do mRNA de *Foxp3* entre AC e HAM, mas não entre AC e SN ou entre HAM e SN. Além do mais, a expressão do mRNA de *Foxp3* foi correlacionada com a carga proviral e a expressão dos mRNA de *tax* e de *sHBZ* apenas no grupo AC. Em conjunto, o que diferenciou o subgrupo AC_L do subgrupo AC_H foi a menor expressão do mRNA de *tax*, a menor expressão do mRNA de *Foxp3* e a maior expressão do mRNA de IFN- γ . Comparando HAM_L vs. HAM_H, HAM_L mostrou nível similar do mRNA de *tax*, mas nível aumentado de IL-10 e diminuído de *Foxp3*. Em conjunto, os dados de expressão dos genes analisados envolvidos na resposta imune apontam para a importância da resposta imune inata na proteção da infecção pelo HTLV-1 e sugere possíveis componentes genéticos na susceptibilidade à HAM/TSP.

Palavras-chave: HTLV-1, carga proviral, *tax*, *HBZ*, Imunidade inata, Imunidade adaptativa, HAM/TSP.

ABSTRACT

About 5% of HTLV-1 carriers may develop an inflammatory disease of the central nervous system known as HAM/TSP (HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis). The HTLV-1 proviral load is an important risk marker for diseases associated with the virus, because symptomatic patients have an average proviral load levels significantly higher than asymptomatic carriers. However, there are asymptomatic carriers (AC) with high levels of proviral load, whereas there are patients with HAM/TSP (HAM) with low levels of proviral load. Therefore, other factors are important in the outcome of the diseases associated with HTLV-1. Here, it were evaluated the levels of *tax* and *sHBZ* mRNA expression besides 22 cellular genes involved in innate and adaptive immune responses (TLR4, IL-12B, CD40, CD40L, CD80, CD86, CD28, perforin, granzyme, FasL, Fas , IFN- γ , TNF- α , IL-8, IL-10, RANTES, CCR1, MIP-1 α , MCP-1, CCR2B, LFA-1 and MMP-9) in individuals AC and HAM classified in low (L) or high (H) proviral load level, using real time RT-PCR. The expression of *tax* and *sHBZ* mRNA were analyzed in 21 AC_L, 16 AC_H, 7 HAM_L and 19 HAM_H, and the cellular genes mRNA expression were analyzed in 14 AC_L, 9 AC_H, 7 HAM_L and 9 HAM_H, beyond 14 seronegative blood donors (SN). There was no significant difference in *sHBZ* mRNA expression normalized by the proviral load between the AC and HAM groups. In contrast, *tax* mRNA load normalized by the proviral load was significantly higher in HAM group than in AC group and in the AC_H vs. AC_L subgroups, but there was no significant difference between HAM_H and HAM_L subgroups. There was significant positive correlation of *tax* and *sHBZ* mRNA expression with the proviral load in AC and HAM groups, but it was stronger in the AC group. The expression level of *tax* and *sHBZ* mRNA were also positively and significantly correlated in the AC and HAM groups, however it was stronger in HAM group. The data showed that the AC individuals are a more heterogeneous group than HAM in relation to *tax* and *sHBZ* mRNAs expression, and should be carefully evaluated when compared with HAM/TSP patients. In conclusion, it is important evaluate the levels of *tax* and *sHBZ* mRNA, and not only the HTLV-1 load proviral, to better estimate the risk of development of

HAM/TSP.

Regarding the 23 cellular genes analyzed, the AC_L subgroup showed the largest number of genes with differential mRNA expression of at least two times comparing to the SN group, with decreased levels of *TLR4* (-2.51x) and increased levels of IFN- γ (2.06x), IL-8 (3.6x) and MIP-1 α (2.63x). The AC_H and HAM_L subgroups presented only one gene with reduced mRNA expression in relation to SN group (-2.29x of MIP-1 α and -3.37x of MMP9, respectively). The HAM_H subgroup not presented mRNA expression variation of at least twice in relation to SN group for none of the genes analyzed. There was a significant difference in *Foxp3* mRNA expression between AC and HAM groups, but not between AC and SN or between HAM and SN. Moreover, *Foxp3* mRNA expression was correlated with the proviral load, *tax* and *sHBZ* mRNA load only in AC group. Together, what differentiated the AC_L subgroup from AC_H subgroup was the lowest *tax* mRNA expression, the lower *Foxp3* mRNA expression and the increased IFN- γ mRNA expression. Comparing HAM_L vs. HAM_H subgroups, HAM_L showed similar level of *tax* mRNA load, but increased level of IL-10 and reduced level of *Foxp3* mRNA expression. Together, the data of gene expression pointed to the importance of the innate immune response in the protection of HTLV-1 and suggests possible genetic component in the susceptibility to HAM/TSP.

Key words: HTLV-1, proviral load, *tax*, *HBZ*, innate immunity, adaptive immunity, HAM/TSP.