

SIMONE CRISTINA OLENSCKI GILLI

**REGULAÇÃO DO GENE GATA3 HUMANO
PELO VÍRUS HTLVI**

Campinas-SP

2004

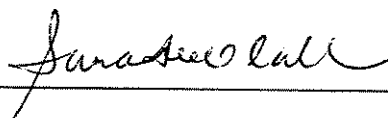
UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÕES

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Doutorado

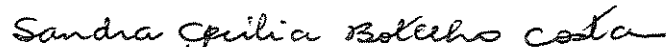
Orientador(a): *Profa. Dra. Sara Teresinha Ollala Saad*

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Sara Teresinha Ollala Saad



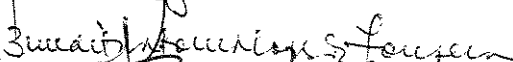
2. Prof(a). Dr(a). Sandra Cecília Botelho Costa



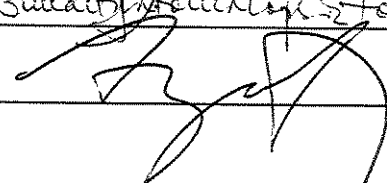
3. Prof(a). Dr(a). Francisco Hideo Aoki



4. Prof(a). Dr(a). Benedito Antonio Lopez da Fonseca



5. Prof(a). Dr(a). Augusto César Penalva de Oliveira



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 19/07/2004

REGULAÇÃO DO GENE GATA3 HUMANO PELO VÍRUS HTLVI

Aluna: Simone Cristina Olenscki Gilli

Orientadora: Prof Dra Sara T. O. Saad

Tese apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de Clínica Médica.

Campinas-SP

2004

UNIDADE	HC
Nº CHAMADA	117 UNICAMP
V	EX
TOMBO BC	60602
PROC	16. 117-04
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	17.12.04
Nº CPD	

bid. 331507

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

G414r

Gilli, Simone Cristina Olenski

Regulação do gene gata3 humano pelo vírus HTLV1 / Simone Cristina Olenski Gilli. Campinas, SP : [s.n.], 2004.

Orientador : Sara Terezinha Olala Saad

Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Transfecção. 2. *Tax. 3. *LLTA. I. Sara Terezinha Olala Saad. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

DEDICATÓRIA

2004/9/36

Aos meus pais Dimas e Gisela, que me mostraram o caminho.

Ao Flávio, Isadora e Felipe, por eles tudo valeu a pena...

AGRADECIMENTOS

Gostaria de prestar meus sinceros agradecimentos:

A todas as pessoas generosas e companheiras do laboratório de biologia molecular e terapia gênica do Hemocentro, em especial à Ângela, Dulcinéia, Heloísa, Adriana, Anderson, Camila, Lena e Nicola que sempre me ajudaram e me deram todo o suporte que precisei.

A Tereza e ao Paulo pelo entusiasmo e competência, e que contribuíram de maneira marcante para a realização desse trabalho.

A todos os médicos da Hemoterapia, principalmente ao Erich e ao Marcelo.

A Arlete, Leo e a Maria Helena que me deram o apoio necessário e tornaram meus dias mais fáceis.

Ao Roberto Zuli, pela contribuição na realização da análise estatística.

A FAPESP e a CAPES que viabilizaram o desenvolvimento desse projeto.

A Dra Joyce, coordenadora do Hemocentro, que depositou em mim uma confiança que espero ter correspondido.

Ao meu marido, que sempre esteve ao meu lado durante toda a realização desse trabalho, me dando o incentivo e coragem necessários.

Agradeço acima de tudo o brilhantismo, a amizade e o exemplo recebidos da Dra Sarita, minha orientadora que me mostrou que tudo é possível, basta querer.

*Não existe nada mais fatal para o pensamento
que o ensino das respostas certas.*

Rubem Alves

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO.....	17
1. Os retrovírus	18
1.1. Retrovírus Human T-lymphotropic virus type I.....	18
1.2. A epidemiologia do vírus HTLV I.....	19
1.3. A transmissão do vírus HTLV I.....	20
1.4. As doenças relacionadas a infecção pelo HTLV I	21
1.4.1. Leucemia Linfoma T do Adulto (LLTA).....	21
1.4.2. Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV I (PET/MAH)....	23
1.4.3. Outras doenças relacionadas à infecção viral.....	24
1.5. Organização molecular do HTLV I.....	24
1.5.1. Tax, o regulador da transcrição	27
1.5.2. Tax, o ativador transcricional.....	28
1.5.3. Tax, o repressor transcricional.	29
1.5.4. Tax, o Inibidor funcional.	30
2. O fator de transcrição GATA3.....	31
2.1. Estrutura e expressão do gene GATA3 humano	33
2.1.1. A estrutura.....	33
2.1.2. Ativação transcricional.....	35
2.1.3. Repressão transcricional.....	35
OBJETIVOS.....	38
MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3. RT-PCR semi quantitativo para análise de expressão do RNAm do gene GATA3 humano em indivíduos contaminados pelo HTLV I	41
3.1. Seleção dos indivíduos estudados	41
3.2. Diagnóstico	41

3.3. Quantificação CD4/CD8	41
3.4. Coleta de amostras	41
3.5. Extração do RNA total e transcrição para cDNA.....	42
3.6. PCR semi-quantitativo	42
4. Análise da interação DNA-proteína.....	43
4.1. Construção das sondas das regiões promotora e silenciadora	44
4.2. Marcação da sonda com isótopo radioativo	44
4.3. Proteína Tax, Sp1 e o vetor de expressão da proteína ZEB	45
4.3.1. Transformação	45
4.3.2. Extração do DNA plasmidial	45
4.3.3. Extração da proteína ZEB	46
4.4. Anticorpos anti-Tax e anti-ZEB	47
4.5. Reação de ligação.....	47
4.6. Análise da interação DNA-proteína	48
5. Análise de expressão gênica através do estudo funcional.....	48
5.1. Construções	48
5.1.1. Construção -96/+598pBLCAT3.....	48
5.1.2. Construções pWTax e pV89A.....	49
5.1.3. Construção do vetor pSIL-GATA3 que contém a região silenciadora do gene GATA3	50
5.1.3.1. Extração de DNA genômico.....	50
5.1.3.2. Amplificação da região silenciadora por PCR	51
5.1.3.3. Clonagem do fragmento amplificado no vetor TA	51
5.1.3.4. Extração do DNA plasmidial	52
5.1.3.5. Clonagem do vetor contendo o silenciador	52
5.1.3.6. Seqüenciamento	53
5.2. Transfecção transitória	54
5.2.1. Linhagem celular	54
5.2.2. Eletroporação.....	54
5.2.3. Lise celular	56
5.2.4. Imunoensaio enzimático colorimétrico (Enzyme linked mmunosorbent assay- E.L.I.S.A.).....	56
5.2.5. Determinação protéica do extrato celular.....	57

RESULTADOS	59
6. Análise da expressão do RNAm do gene GATA3.....	60
6.1. Quantificação CD4/CD8	60
6.2. RT-PCR semi-quantitativo	61
7. Análise da interação DNA/proteína	62
7.1. Obtenção da proteína ZEB	63
7.2. Avaliação, através da técnica de análise de retardamento em gel, da interação entre a proteína transativadora viral Tax, o promotor do gene GATA3 e seu silenciador.....	64
7.2.1. Tax isoladamente não se liga ao promotor do GATA3	64
7.2.2. A interação entre Tax e o promotor do GATA3.....	65
7.2.3. A interação entre Tax e o silenciador do promotor do GATA3	67
8. Análise da expressão gênica	69
8.1. Construção do vetor pSIL-GATA3 que contem a região silenciadora do gene GATA3 ..	69
8.1.1. Reação de PCR.....	70
8.1.2. Ligação ao vetor PCR®2.1.....	70
8.1.3. Sequenciamento da construção pSIL-GATA3	71
8.2. Confirmação das construções recebidas.....	73
8.3. Transfecção transitória	74
8.3.1. Tax induz atividade discreta no promotor mínimo do gene GATA3	74
8.3.2. Tax reprime a atividade do promotor do gene GATA3 na presença do silenciador do gene	75
DISCUSSÃO	77
CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXO I.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Adenosine Monophosphate
AMPC	cyclic- Adenosine Monophosphate
AMV	<i>Avian myeloblastosis virus</i>
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
ATF	<i>Activating transcription factor</i>
BLV-HTLV	<i>Bovine leukemia virus- Human T-Lymphotropic Virus</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CD	<i>Clustter differentiation</i>
CDK	<i>Ciclin dependent kinases</i>
CRE	<i>cyclic AMP responsive elements</i>
CREB	<i>cyclic AMP responsive element binding protein</i>
CREM	<i>CRE modulator protein</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	ácido etilenodinitrotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>
GST	Glutathione S-transferase
HEB	<i>HeLa Ebox-binding</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HLA	<i>Histocompatibility leucocyte antigen</i>
HS	<i>Hipersensitiviy site</i>
HTLVI	<i>Human T-Lymphotropic Virus type I</i>
IKK	I KappaB kinase
IL	Interleucina
IPTG	Isopropil-beta-D-thiogalactosidase
Kb	Kilobase
LB	meio Luria Bertani

LLTA	Leucemia/Linfoma T do Adulto
LTR	<i>Long terminal repeat</i>
MAD	<i>Mytotic arrest defective</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility complex</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κ binding</i>
NH ₄ Cl	Cloreto de amônia
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônia
NK	<i>Natural Killer</i>
ORFs	<i>Open Reading Frames</i>
pb	pares de bases
PBS	Phosfato buffered saline
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PET/MAH	Paraparesia Espástica Tropical/ Mielopatia Associada ao HTLV I
PMSF	phenyl methyl sulfonyl fluoride
Poli DI-DC	ácido poly-deoxy-inosinic-deoxy-cytidilico
PTHrP	<i>Parathyroid Hormone-related Protein</i>
r.p.m.	rotações por minuto
Rb	proteína supressora do retinoblastoma
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPMI	meio desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	<i>reverse transcription-polimerase chain reaction</i>
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SER	<i>Serum responsive elements</i>
SNC	Sistema nervoso central
SV40	Simian vírus 40
TAE	Tris-ácido acético-EDTA
TCR	<i>T Cell Receptor</i>
TER	<i>Tax Responsive Elements</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>

Th	<i>T helper</i>
TNF	<i>Tumoral Necrosis Factor</i>
YY1	Yin Yang 1
ZEB	<i>Zinc-finger E-Box</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização molecular do vírus HTLV1..	25
Figura 2: Estrutura do fator de transcrição GATA..	31
Figura 3: Estrutura do gene GATA3 humano..	34
Figura 4: Sequência do silenciador do gene GATA3 humano..	36
Figura 5: Representação da construção com o promotor mínimo do gene GATA3.	49
Figura 6: Representação da técnica ELISA “sandwich”..	57
Figura 7: RT-PCR semi-quantitativo.....	61
Figura 8: Gráfico representativo do resultado do RT-PCR semi-quantitativo.	62
Figura 9: Plasmídeo de expressão da proteína ZEB..	63
Figura 10: Proteína ZEB. Eletroforese em gel SDS corado com azul de Comassie..	64
Figura 11: Tax não se liga isoladamente ao DNA.....	65
Figura 12: Sp1 promove a interação de Tax no promotor de GATA3.....	66
Figura 13: ZEB promove a interação de Tax no silenciador do promotor de GATA3..	68
Figura 14: PCR região silenciadora.....	70
Figura 15: Digestão da construção pSIL-GATA3.....	71
Figura 16: Eletroferograma da construção pSIL-GATA3.	72
Figura 17: Representação esquemática da construção pSIL-GATA3.....	73
Figura 18: Digestões das construções -96/+598pBLCAT3, pWTax e pV89A..	73
Figura 19: Gráfico representativo da atividade de Tax no promotor do gene GATA3.....	75
Figura 20: Gráfico representativo da atividade de Tax no silenciador do promotor do gene GATA3.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Seqüência dos primers para RT-PCR semi-quantitativo.	43
Tabela 2: Sondas para o ensaio de gel-shift..	44
Tabela 3: Esquema das reações de ligação entre o promotor do gene GATA3 e Tax..	47
Tabela 4: Esquema das reações de ligação entre o silenciador do promotor do gene GATA3 e Tax	48
Tabela 5: Seqüências dos primers utilizados no PCR da região silenciadora.	51
Tabela 6: Seqüências dos primers para seqüenciamento da construção pSIL-GATA3..	54
Tabela 7: Associações de plasmídeos para transfecções transitórias.	55
Tabela 8: Quantificação da população de linfócitos T.	60

RESUMO

A infecção pelo vírus linfotrópico de células T tipo I (HTLV I) tem sido associada à leucemia/linfoma T do adulto (LLTA), à paraparesia espástica tropical/ mielopatia associada ao HTLV I (PET/MAH), à uveíte e, recentemente, à Síndrome de Sjögren e outras doenças do sistema conjuntivo. Os fatores que determinam a evolução para essas doenças relacionadas à infecção são desconhecidos, mas podem estar ligados à predisposição genética e à resposta imune do hospedeiro. Camundongos com ausência do gene GATA3 demonstram várias e graves anormalidades morfológicas e fisiológicas no sistema nervoso central e periférico, além de comprometimento da hematopoese durante o desenvolvimento embrionário. Há, portanto, semelhanças entre os sistemas comprometidos na ausência do gene GATA3 e aqueles alterados secundariamente à infecção pelo HTLV I.

Vários estudos sugerem que uma fosfoproteína viral presente no HTLVI, denominada Tax, ative a transcrição de vários genes envolvidos na produção de citocinas ou na resposta e na proliferação celular, como c-fos, c-myc, erg-1, IL-1, IL-2, GM-CSF. Entretanto, a relação entre a infecção pelo vírus HTLV I e o fator de transcrição GATA3 ainda não havia sido determinada.

Os objetivos do presente trabalho foram caracterizar a relação entre o fator de transcrição GATA3 e o vírus HTLV I, utilizando-se, para tanto, a técnica de RT-PCR semi-quantitativo; analisar a relação entre o fator de transcrição GATA3 e o vírus HTLV I, por meio de estudos de interação DNA/proteína; e demonstrar, por estudos funcionais em modelos celulares *in vitro*, a resposta das regiões de controle transcricional do gene GATA3 à proteína Tax.

Demonstramos, através do RT-PCR semi-quantitativo que ocorre uma evidente redução na expressão do gene GATA3 em portadores saudáveis da infecção pelo HTLVI, e também de forma mais acentuada nos portadores de Leucemia Linfoma T do Adulto e Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia associada ao HTLVI. Estudos *in vitro*, que utilizaram construções com o gene reporter CAT direcionado pelo promotor e silenciador do gene GATA3 co-transfectados com vetores de expressão da proteína Tax e seu mutante, revelaram que Tax exerce atividade discreta no promotor de gene GATA3, mas reprime de

modo marcante a atividade do promotor na presença de seu silenciador. Essa repressão provavelmente ocorre através da interação de Tax com o fator de transcrição ZEB, o silenciador do promotor do gene GATA3, uma vez que interação deste com a proteína Tax foi demonstrada no estudo de retardamento em gel.

O estudo demonstrou, pela primeira vez, a regulação do gene GATA3 pelo vírus HTLVI. Essa regulação pode estar envolvida na fisiopatologia das doenças relacionadas à infecção pelo HTLVI.

ABSTRACT

The HTLV-I nonstructural protein Tax plays a crucial role in cellular transformation. It activates the transcription factors of various cellular genes and interacts with cellular proteins. Limited data are available on the interaction between specific T cell transcription factor GATA3 and Tax. Implication for the significance of GATA3 on T-cell development and function, (Th2) differentiation, and a role of GATA3 during immune response has been reported. To determine the effect of the Tax protein on GATA3 gene expression, we investigated the interaction between this protein and the GATA3 promoter and repressor regions. The semi quantitative RT-PCR demonstrated a considerable decrease in the expression of the GATA 3 cDNA all subjects infected by HTLV I and no expression of GATA 3 mRNA was observed in one subject with ATLL and another with HAM/TSP. Results demonstrated an interaction between Tax and GATA3 gene and a role of Tax in the negative regulation of GATA3 expression, through its interaction with the repressor, ZEB. This interaction may be involved in the pathophysiology of adult T cell leukemia/lymphoma and tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy.

Introdução

1. Os retrovírus

Os vírus ocupam uma posição única dentro da biologia. Apesar de apresentarem algumas propriedades de sistemas vivos, como possuírem um genoma, eles são atualmente considerados entidades infecciosas não vivas, não sendo, portanto, caracterizados como microorganismos.

Os vírus pertencem à biologia por possuírem genes, replicarem-se, evoluírem e adaptarem-se a hospedeiros particulares, “habitats” bióticos e nichos ecológicos. Entretanto, os vírus não podem capturar e estocar energia livre e não são funcionalmente ativos fora de suas células hospedeiras. Esta estrutura simples somente torna-se parte de um sistema vivo após infectar uma célula hospedeira e seu genoma integrar-se ao genoma celular. São, portanto, entidades infecciosas não vivas que “emprestam” outra vida.

A família *Retroviridae*, que inclui sete gêneros (*Avian type C retrovirus*, *BLV-HTLV retrovirus*, *Lentivirus*, *Mammalian type B retrovirus*, *Mammalian type C retrovirus*, *Spumavirus* e *Type D retrovirus*), compreende uma variedade de vírus RNA envelopados, como os retrovírus endógenos, os vírus relacionados à leucemia ou o vírus da imunodeficiência humana, com estratégias de replicação que incluem a transcrição reversa do RNA viral em dupla fita de DNA, a qual se integra ao genoma celular na forma de um pró-vírus. Os pró-vírus variam em tamanho de 7 a 12 kb e são linearizados, não segmentados e apresentam polaridade positiva. Todas os retrovírus contêm genes para a produção das proteínas gag, pol, env e, freqüentemente, pro, enquanto os retrovírus mais complexos, como o HIV-1, contêm proteínas regulatórias adicionais.

1.1. Retrovírus Human T-lymphotropic virus type I

O HTLV I (Human T-lymphotropic virus type I) é membro do gênero *BLV-HTLV retrovirus*. O pró-vírus de portadores do HTLV I está aleatoriamente integrado ao genoma do hospedeiro, sendo que seu sítio de integração é específico para cada célula infectada pelo HTLV I. Postula-se que o aumento da carga viral de HTLV I ocorre não pela replicação viral, mas sim como consequência da proliferação clonal da célula infectada. Uma alta taxa de replicação viral gera uma vasta diversidade de genomas e,

conseqüentemente, altas taxas de mutação, como ocorre com o HIV-1. O processo de replicação viral resulta em maior possibilidade de resistência a drogas e escapes do sistema imune. O HTLV I, ao contrário do HIV-1, aumenta seu número de cópias pela proliferação de células infectadas, o que torna o vírus geneticamente mais estável.

Acredita-se que, em todo o mundo, aproximadamente 20 milhões de pessoas estejam infectadas com o vírus HTLV I (MATSUOKA, 2003). Este vírus infecta predominantemente células T CD4+ e está associado a um amplo espectro de neoplasias, imunodeficiências, doenças neurológicas, bem como à viremia assintomática.

1.2. A epidemiologia do vírus HTLV I

O primeiro isolamento do vírus linfotrópico de células T tipo I (HTLV I) é creditado a foi feito por Takatsuki et al no Japão em 1977 (TAKATSUKI et al., 1985) embora tenha sido descrito pela primeira vez por Poiesz et al em 1980 (POIESZ et al., 1980), que o isolou em culturas celulares de um paciente afro-americano originalmente considerado portador de um linfoma T cutâneo (posteriormente classificado como leucemia/linfoma de células T do adulto). Apesar da possibilidade de que a infecção pelo HTLV I possa existir em qualquer região do mundo, taxas de infecção moderadas a altas têm reportadas em certas regiões, como a Sudeste do Japão (BLATTNER et al., 1985), Caribe (GALLO et al., 1982), região centroeste da África (WIKTOR et al., 1990) (BOURGEOIS et al., 1998) (BLAYNEY et al., 1983; BOURGEOIS et al., 1998), sudeste dos Estados Unidos (BLAYNEY et al., 1983), Melanésia (YANAGIHARA et al., 1990) e regiões da América do Sul (NOGUEIRA et al., 1996). O HTLV I tem se mostrado altamente prevalente em certas populações do Oriente Médio (MEYTES et al., 1990) e Índia (SINGHAL et al., 1993). Existem duas hipóteses para explicar a origem geográfica do HTLV I no Novo Mundo. A primeira relaciona a introdução do vírus com a migração Mongol pelo Estreito de Bering, e a segunda com o tráfico de escravos africanos (GESSAIN et al., 1993)

Na América do Sul existem regiões com grande prevalência de população de origem africana como Tumaco na Colômbia, Bahia no Brasil e Chíncha no Peru. A prevalência do HTLV I varia de 2 a 5% entre a população dessas regiões.

A introdução do HTLV I no Brasil ocorreu através da imigração japonesa e de escravos africanos provenientes da Nigéria, Senegal, Sudão, Angola e Moçambique. Em 1986 foi descrita uma alta prevalência desse vírus entre imigrantes japoneses (13%) e seus descendentes (8%) moradores de Campo Grande – MS (KITAGAWA et al., 1986). Atualmente, estima-se que a prevalência entre doadores de sangue seja de aproximadamente 0,45%, podendo variar de acordo com a região geográfica. Assim, em Salvador tal prevalência é estimada em torno de 1,8% e em Florianópolis ao redor de 0,08% (ARAUJO ADE e DE ANDRADA-SERPA, 1996).

1.3. A transmissão do vírus HTLV I

A infecção pelo HTLV I usualmente apresenta curso longo e assintomático na maioria dos indivíduos infectados. O vírus pode ser transmitido por mães infectadas aos seus filhos intra-útero e por ocasião do parto. Entretanto, em contraste com o modo de transmissão perinatal do HIV 1 e 2, a transmissão mãe-filho do HTLV I, estimada em 20%, ocorre primariamente pelo aleitamento materno. A probabilidade da transmissão é diretamente proporcional ao tempo de aleitamento e ao título de anticorpos maternos. O tempo estimado de soroconversão na criança varia entre 1 e 3 anos (NYAMBI et al., 1996).

O HTLV I pode ser detectado no sêmen e secreção cervical de indivíduos infectados, sendo a transmissão heterossexual do homem para a mulher a mais eficiente entre as formas de transmissão sexual (KAJIYAMA et al., 1986).

O uso compartilhado de agulhas e seringas contaminadas pelo HTLV I representa um fator de risco na transmissão, porém existem poucos relatos com dados que determinem e quantifiquem a associação entre soropositividade anti HTLV I/II e práticas específicas do uso de drogas injetáveis ilegais.

A transfusão de componentes sanguíneos celulares contaminados como forma de transmissão da infecção pelo HTLV I é bem documentada. É uma das formas mais eficientes de transmissão, com taxa de soroconversão de aproximadamente 50% entre os contaminados (KAMIHIRA et al., 1987; OKOCHI et al., 1984), podendo levar ao desenvolvimento de doenças relacionadas à infecção em um período de 6 meses. O sangue

estocado por mais de 6 dias diminui consideravelmente o risco de transmissão transfusional. A confirmação da transmissão do HTLV I por transfusão sanguínea determinou a introdução da triagem sorológica pelos serviços de hemoterapia em todas as unidades de sangue doado no Brasil em 1993.

1.4. As doenças relacionadas à infecção pelo HTLV I

1.4.1. Leucemia Linfoma T do Adulto (LLTA)

Em 1977 diagnosticou-se no sudoeste do Japão um tipo particular de doença linfoblástica de células T, de caráter endêmico, associada a lesões ósseas, hipercalcemia e rápida progressão para óbito, caracterizada pela proliferação clonal maligna de linfócitos T multilobulados ("flower cells") (UCHIYAMA et al., 1977), posteriormente classificados fenotipicamente como CD2+, CD3+, CD4+, CD8- e HLA-DR+. As células leucêmicas demonstravam interação individual monoclonal com o pró-vírus do HTLV I.

Posteriormente, o HTLV I foi identificado em linhagens celulares derivadas de um paciente com linfoma de células T cutâneo (POIESZ et al., 1980) e foi demonstrada uma estreita ligação entre LLTA e HTLV I através da presença de anticorpos contra antígenos virais em pacientes com LLTA (HINUMA et al., 1981). O HTLV I foi, a partir dessas evidências, o primeiro retrovírus a ser associado a uma doença humana, com importantes consequências nas esferas da medicina e virologia.

No Japão, onde calcula-se que exista uma população de 1,2 milhões de indivíduos infectados pelo HTLV I, aproximadamente 800 novos casos de LLTA são diagnosticados anualmente (TAJIMA e KUROISHI, 1985). O risco cumulativo da incidência de LLTA entre portadores do HTLV I no Japão foi estimado em 6.6% para homens e 2.1% para mulheres, indicando que a maioria dos portadores permanece assintomática durante toda a vida (ARISAWA et al., 2000).

São descritas quatro apresentações clínicas de LLTA: aguda, crônica, linfomatosa e "smoldering" que, de modo geral, diferenciam-se entre si de acordo com o curso clínico, extensão da doença e nível de cálcio sérico (SHIMOYAMA, 1991; TAKATSUKI et al., 1985; YAMAGUCHI et al., 1983).

Na sua forma aguda leucêmica, a doença caracteriza-se por leucocitose intensa com a presença de “flower cells”, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia rapidamente progressivas, envolvimento cutâneo, pulmonar, da medula óssea, do trato intestinal e do sistema nervoso central. A hipercalcemia ocorre com ou sem lesões osteolíticas. As células neoplásicas têm características imunofenotípicas de células T (UCHIYAMA et al., 1977). As remissões induzidas por terapia usualmente são de curta duração e as infecções oportunistas são complicações comuns. Apesar do esquema quimioterápico intensivo, a sobrevida média é de 6 meses.

A forma aguda linfomatosa da LLTA é caracterizada por ser localizada, principalmente em linfonodos, e pela ausência de leucocitose intensa. Sugere-se o diagnóstico pela presença de células com núcleo multilobulado e fenótipo CD4+, HLA-DR+ e CD25+. A sobrevida média desses pacientes é de 10 meses.

A forma “smoldering” caracteriza-se pela presença de um número relativamente pequeno de células leucêmicas circulantes, além de lesões cutâneas e, ocasionalmente, pulmonares, manifestando-se de forma indolente, podendo persistir por anos.

A LLTA, em sua apresentação crônica, é acompanhada por aumento do número de células leucêmicas circulantes e infiltração de pele, fígado, baço e pulmões. A sobrevida média é de 24 meses.

Mais recentemente, descreveu-se também a presença do pró-vírus do HTLV I em células T de pacientes com micose fungóide e Síndrome de Sezary (HALL et al., 1991; ZUCKER-FRANKLIN e PANCAKE, 1998).

O risco estimado que um portador do HTLV I apresenta de desenvolver a LLTA varia entre 4 e 5% (TOKUDOME et al., 1989), e o tempo estimado entre a infecção pelo vírus e a manifestação da doença é de aproximadamente 30-50 anos (MURPHY et al., 1989; TAJIMA e KUROISHI, 1985). Essa latência é evidenciada pelo fato de que, na maioria dos casos, a infecção pelo HTLV I é adquirida ao nascimento e a doença manifesta-se na idade adulta, usualmente após os 40 ou 50 anos de idade. Casos descritos de LLTA associados à transfusão de hemoderivados são raros.

1.4.2. Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV I (PET/MAH)

A LLTA representa uma doença de replicação e expansão não controladas de um único clone de células T. Em contrapartida, a PET/HAM é associada à ativação e proliferação oligoclonal/policlonal de células T acompanhadas por um processo inflamatório crônico que afeta o sistema nervoso central. Existem dois modelos principais propostos para explicar a inflamação crônica e a degeneração do sistema nervoso central: um modelo autoimune e um modelo citotóxico (HOLLSBERG e HAFLER, 1995). Várias evidências, entretanto, apóiam o modelo citotóxico. Primeiramente, pacientes com PET/HAM de haplótipo HLA-A2 carregam uma alta frequência (aproximadamente 1:500) de células T citotóxicas CD8+ (HLA-A2 restrito) reativas a Tax (ELOVAARA et al., 1993; JACOBSON et al., 1990). Além disso, demonstrou-se que os astrócitos expressam RNAm Tax de HTLV I, detectado por hibridização *in situ* (LEHKY et al., 1995). Portanto, a apropriada identificação de uma célula alvo imune e a existência de células T citolíticas específicas para Tax de HTLV I embasam o modelo citotóxico para a patogênese dessa doença. Uma vez que a transmissão não celular do HTLV I provavelmente não ocorre, não está claro como os astrócitos são infectados. Achados histopatológicos mostram uma combinação de linfócitos T CD4+ e CD8+ infiltrando o SNC durante as fases mais precoces da doença, seguidas pelo predomínio de linfócitos CD8+ nas fases mais tardias. Também demonstrou-se a presença de monócitos infectados em pacientes com PET/HAM, que poderiam servir como veículos para a introdução do HTLV I no SNC. É possível que uma infiltração inicial de linfócitos T e/ou monócitos possam conter células infectadas com capacidade de transmitir o HTLV I para os astrócitos, o que é seguido de uma infiltração de linfócitos T CD8+ específicos para HTLV I que teriam como alvos as células infectadas. Entretanto, ainda necessita confirmação quais seriam os alvos primários das células T citolíticas na PET/HAM, se os astrócitos, outras células do SNC ou os linfócitos T CD4+ infectados pelo HTLV I (KOYANAGI et al., 1993). As evidências que embasam o modelo autoimune na fisiopatologia da doença são indiretas. Citocinas secretadas por células inflamatórias que infiltram o SNC (linfócitos CD4+ infectados pelo HTLV I auto-reativos)

seriam suficientes para causar dano tissular; entretanto, a natureza de tais células T auto-reativas, sua especificidade antigênica e a população celular alvo não foram definidas. É possível que ambos os mecanismos, citotóxico e autoimune, contribuam para a patogênese da PET/HAM. Entretanto, os dois modelos falham em explicar porque o cordão espinhal torácico é o sítio-alvo preferencial para a infiltração e inflamação tissulares, ou ainda o porquê da característica paresia espática vista nesta doença.

Clinicamente, trata-se de uma doença crônica, progressiva, desmielinizante, que afeta predominantemente o cordão espinhal. A doença é relatada em 0,2 a 5% dos indivíduos infectados (KAPLAN et al., 1990), sendo mais freqüente em mulheres que em homens (2:1). Tipicamente a doença desenvolve-se na quarta década de vida, configurando um longo período de incubação, e progride por um período de 5-10 anos tendendo a estabilizar-se com um grau severo de deficiência motora e sensitiva. Os principais sintomas de início da doença são astenia e perda da força muscular em membros inferiores (OSAME et al., 1987; VERNANT et al., 1987), além de dor lombar, perda de sensibilidade com caráter menos expressivo que o comprometimento motor, urgência e incontinência urinárias, hiperreflexia de membros inferiores e presença do reflexo de Babinski. A doença progride com constipação, megacolo e impotência nos homens. Linfócitos atípicos podem ser encontrados tanto no sangue periférico como no líquido.

1.4.3. Outras doenças relacionadas à infecção viral

O HTLV I tem sido associado ocasionalmente a outras doenças como Síndrome de Sjögren (NAKAMURA et al., 1997), doença de Behcet (KANAZAWA et al., 1993), polimiosite (MORGAN et al., 1989), poliartrite (NISHIOKA et al., 1993), tireoidite (UCHIYAMA, 1997) e uveíte (MOCHIZUKI et al., 1992), condições essas que acreditam-se causadas por mecanismos auto-imunes. Estrongiloidíase maciça também tem sido associada à infecção pelo HTLV I (PATEY et al., 1992).

1.5. Organização molecular do HTLV I

Num genoma de aproximadamente 9 kb estão codificadas as proteínas estruturais do vírus conhecidas como Gag e Env, enzimas como a transcriptase reversa, integrase e

protease, e proteínas regulatórias (SEIKI et al., 1983). Ambas as terminações do genoma são margeadas por reproduções diretas não codificadas conhecidas como "long terminal repeat" (LTR). As LTRs mediam a integração pró-viral e contêm elementos regulatórios importantes para a transcrição viral, o processamento do RNAm viral e a transcrição reversa (figura 1A). Além disso, existe uma região única entre a região *env* e o 3'-LTR, denominada região pX, que contém 4 pequenas ORFs ("Open Reading Frames" ou estruturas de leitura aberta): X-I, X-II, característicos dos retrovírus, e X-III e X-IV. As ORFs X-III e X-IV codificam as proteínas regulatórias p27^{Rex} (Rex) e p40^{Tax} (Tax), respectivamente (SEIKI et al., 1983).

Existem pelo menos três tipos de RNAm detectados em células infectadas pelo HTLV I: o RNAm genômico ou "unspliced", e dois subgenômicos: os RNAm "spliced" simples (4.3 Kb) e duplo (2.1 Kb) (SEIKI et al., 1983; SLAMON et al., 1984). O genoma do HTLV I está graficamente representado na figura abaixo (figura 1B).

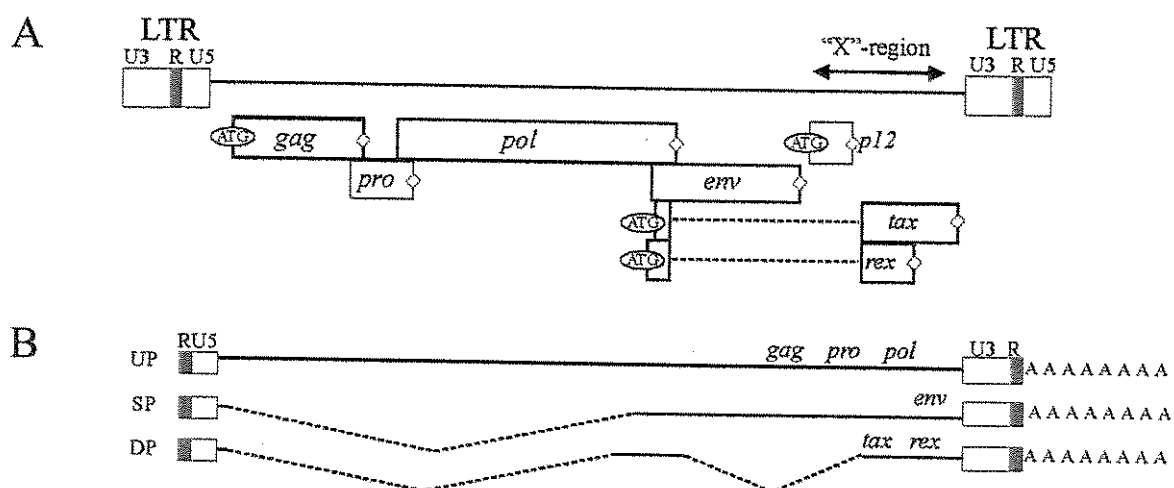


Figura 1: Organização molecular do vírus HTLV I. A: Organização do genoma. O LTR está em negrito. Início translacional (ATG) e "stop codons" estão indicados. "X" denota as regiões de interação que contêm várias "ORFs". B: HTLV produz vários espécies de RNA por "splicing" alternativo. As linhas cheias representam os exons e as vazias os introns. P12 pode ser expressa por "splicing" duplo ou simples do RNAm. UP: não "splicing"; SP "splicing" simples; DS: duplo "splicing" (FERREIRA et al., 1997).

As proteínas precursoras gag/pol são codificadas pelo RNAm genômico (“unspliced”) completo. A proteína precursora traduzida (pr53) é clivada pela protease viral em proteína matriz p19, proteína capsídeo p24 e nucleoproteína p12 que se liga ao RNA genômico na partícula viral madura (MADOR et al., 1989).

O produto do gene *pol* é transcrito pelo mesmo RNAm de uma estrutura diferente do gag (SHIMOTOHNO et al., 1985). Um rearranjo ribossomal redireciona a maquinaria translacional para ler a mensagem do gene *pol* produzindo a proteína precursora gag/pol (MADOR et al., 1989). Este rearranjo ocorre com uma frequência baixa, de tal forma que é produzida mais pr53 que o precursor gag/pol. Esta última proteína é clivada pela protease para a produção da transcriptase reversa viral e integrases, em adição às anteriormente mencionadas proteínas Gag. As duas proteínas pol são importantes nos estágios iniciais após a infecção e mediam a transcrição reversa do RNA viral em DNA e a integração do DNA ao genoma humano como pró-vírus.

O RNAm “single-spliced” de 4.3 kb codifica a proteína de envelope precursora (gp61), a qual é clivada por uma enzima celular desconhecida para produzir a proteína transmembrana gp21 e a proteína de superfície gp46 Env. Gp46 Env interage com um receptor celular ainda não identificado, facilitando a entrada do vírus na célula.

O RNAm “double-spliced” de 2,1 kb codifica pelo menos duas importantes proteínas regulatórias, Tax e Rex, além da p21^{X-III}. Tax é codificada pela ORF X-IV e Rex pela ORF X-III. No HTLV I, Tax é uma proteína de 40-kD (p40^{tax}). Ainda não está muito bem definido o papel de p21^{X-III} no ciclo de vida do vírus, embora tenha sido sugerido que essa proteína possa antagonizar a função de Rex (FURUKAWA e SHIKU, 1991).

A proteína Rex estabiliza ou facilita o transporte de RNAm “unspliced” do núcleo para o citoplasma permitindo a expressão de proteínas do core viral, assim como fornecendo RNA para a produção de novos vírus.

A ORF I da região pX codifica a proteína p12^I, a qual está presente no retículo citoplasmático e no complexo de Golgi. A proteína p12^I tem mostrado papel importante no estabelecimento da infectividade pelo vírus HTLV I, codificando pelo menos quatro supostos sítios de ligação para SH3, conhecidos pela importância nas interações proteína-

Introdução

proteína (ALEXANDROPOULOS et al., 1995) . Aparentemente também interage com uma ATPase de H⁺ vacuolar, envolvida no transporte de prótons para dentro de organelas celulares (FRANCHINI et al., 1993; SCHLEGEL et al., 1986). A proteína p12^I também se liga à cadeia β do receptor de interleucina 2, em uma região que também se liga à p56^{lck} quinase envolvida na ativação da célula T pela IL-2.

Outras proteínas codificadas pela ORF II no HTLV I (p30^{II} e p13^{II}) foram descritas, sem papel ainda bem estabelecido no ciclo de vida viral ou na transformação celular induzida pelo vírus.

O HTLV I utiliza-se de estratégias redundantes para aumentar a sua infectividade através das proteínas Tax e p12, as quais promovem a proliferação celular, inibição da apoptose e aumento da instabilidade genética.

1.5.1. Tax, o regulador da transcrição

Entre todas as proteínas do HTLV I, Tax tem papel central na patogênese viral. É uma fosfoproteína que regula a transcrição viral através da interação com três elementos amplificadores 21-bp localizados na região U3 do LTR pró-viral (ZHAO e GILM, 1991). Esta região contém várias regiões de DNA com homologia a conhecidos sítios de ligação de fatores transcricionais celulares, como o elemento responsivo do AMP cíclico (“cyclic-AMP-responsive element binding” – CREB), o fator nuclear κB (“nuclear factor κB” - NF-κB) e o elemento responsivo sérico (“serum responsive element” – SRE). É um potente ativador transcricional do LTR viral e de vários outros genes celulares envolvidos na ativação e crescimento de células T. Tax potencialmente aumenta a expressão de genes virais através do LTR viral e também estimula a transcrição de genes celulares através de vias de sinalização celulares de NF-κB, CREB, SRE e AP-1. Tax não se liga diretamente às seqüências dos promotores ou facilitadores (“enhancers”) desses genes, mas interage com proteínas celulares que são fatores de transcrição ou moduladores de funções celulares (parece mediar seu efeito através da ativação de diferentes fatores de transcrição celular que por sua vez se ligam ao LTR e ativam a transcrição viral) (ZHAO e GILM, 1991).

1.5.2. Tax, o ativador transcricional

Pelo menos dois elementos responsivos a Tax (TRE – “Tax Responsive Elements”) estão localizados dentro da porção U3 do LTR viral: TRE-1 e TRE-2. TRE-1 contém sítios de ligação para fatores de transcrição de membros da família dos elementos de ligação responsivos ao AMP cíclico (CREB/ATF – “cyclic AMP responsive element binding family of transcription factors”), enquanto TRE-2 liga-se a uma variedade de fatores de transcrição como ets-I e Sp1, e Myb (BOSELUT et al., 1990; BOSELUT et al., 1992; GITLIN et al., 1991). Tax pode ligar-se diretamente ao CREB e a proteínas moduladoras de elementos responsivos ao AMP cíclico (CREM), aumentando a atividade desses fatores (SUZUKI et al., 1993). Uma vez ativados, esses fatores de transcrição também podem induzir a transcrição de outros genes celulares. Para a ativação da LTR viral, Tax requer ao menos dois facilitadores (“enhancers”) de 21-bp contendo um elemento responsivo ao AMPc imperfeito, ao qual a proteína ligadora do elemento responsivo ao AMPc (CREB) se liga (ZHAO e GILM, 1992). Tax pode se ligar tanto à CREB quanto à proteína ligadora de CREB (CBP), da qual é um coativador transcricional (KWOK et al., 1996). Sob condições fisiológicas, apenas CREB fosforilada induzida por estimulação pode se ligar à CBP e ativar a transcrição (CHRIVIA et al., 1993). Tax desvia este caminho, resultando em ativação da via de CREB independente de estimulação. CBP acetila histona e abre a estrutura do nucleossomo ao redor do sítio transcricional.

Tax pode ativar a via de NF- κ B através da interação com IKK γ . IKK α , β e γ formam um complexo de 700 kDa, ao qual Tax é adaptada funcionalmente através de IKK γ (JEANG, 2001; JIN et al., 1999). O complexo ativado fosforila I κ B, o qual separa NF- κ B, resultando na ativação de NF- κ B. A ativação de NF- κ B induz à transcrição dos genes de várias citocinas e de seus receptores, bem como de numerosos genes associados à apoptose e ao ciclo celular. Esta interação vírus/hospedeiro torna induzíveis por Tax os genes responsivos ao NF- κ B que codificam IL-2, IL-2R α e outros fatores que comandam a transdução do sinal de crescimento (BALLARD et al., 1988; LEUNG e NABEL, 1988; MIYATAKE et al., 1988; RUBEN et al., 1988). A expressão persistente e não transitória

desses genes responsivos ao NF- κ B na presença de Tax provavelmente contribui para o início e/ou manutenção do fenótipo maligno.

Outras proteínas transportadoras com regiões homólogas a esse gene podem se ligar à Tax. Entre elas está uma proteína inibidora do ciclo celular chamada p16^{INK4A} (HANNON e BEACH, 1994; SUZUKI et al., 1996). A inativação funcional de p16^{INK4A} poderia contribuir de forma crítica para o desenvolvimento da leucemia-linfoma T do adulto.

Como já bem estabelecido, as proteínas transformadoras de vírus de DNA tumoral, como o antígeno T do SV40, E7 do papiloma vírus humano, E1A do adenovírus, ligam-se à Rb e suprimem sua função negativa para E2F (HOROWITZ et al., 1988; NEVINS, 1992; WHYTE et al., 1988). A proteína p16^{INK4A} é um regulador negativo de Rb. Assim, parece que o retrovírus HTLV I e os vírus de DNA tumoral suprimem uma única via de sinalização negativa através de diferentes moléculas. Isto pode sugerir a importância crítica da via de sinalização de Rb para as células normais manterem seus fenótipos normais.

Vários outros promotores de genes celulares responsivos à transativação de tax foram identificados: cadeia α IL-2R proteína relacionada ao hormônio da paratireóide (PTHrP), GM-CSF, c-fos, egr-1, MHC classe I, c-sis, vimetina, IL-1, IL-2, IL-3, IL-6 e TNF- β (FERREIRA et al., 1997).

1.5.3. Tax, o repressor transcricional.

Por outro lado, Tax pode reprimir a transcrição de certos genes, como o gene da polimerase β de DNA (JEANG et al., 1990), os genes *lck* (LEMASSON et al., 1997), *p18* e *p53* (SUZUKI et al., 1999b). Para a trans-repressão da transcrição do gene *p18*, a proteína Tax interfere na ligação de E47 ao coativador transcricional p300, resultando na repressão da transcrição do gene *p18* (SUZUKI et al., 1999b). A transcrição dependente de *p53* também é reprimida pela proteína Tax. De forma semelhante à trans-repressão do gene *p18*, Tax não se liga diretamente a *p53* ou aos sítios de ligação de *p53*, mas inibe o recrutamento de CBP nos sítios de ligação de *p53* (ARIUMI et al., 2000; SUZUKI et al., 1999b). Este

mecanismo de trans-repressão contrasta com aquele da trans-ativação da via de CREB pela proteína Tax. Embora ambos os mecanismos dependam da ligação de Tax ao ativador transcricional, CBP/p300, seus efeitos na transcrição são bastante diferentes (YOSHIDA, 2001).

1.5.4. Tax, o Inibidor funcional.

Além da regulação transcricional, Tax pode influenciar na função de determinados fatores celulares. A proteína Tax interage com p16^{INK4A}, um inibidor do CDK4 (cyclin-dependent kinase-4), através de seu sítio anquirina, comprometendo sua função (SUZUKI et al., 1996). Uma vez que p16^{INK4A} é um inibidor de CDK4, sua inibição funcional leva à ativação de CDK4/6, à fosforilação de Rb e, finalmente, à progressão de G1 para S no ciclo celular.

TGF- β (transforming growth factor β) é uma citocina inibidora que desempenha importantes papéis no desenvolvimento como um todo, no sistema imune e na oncogênese. Uma vez que TGF- β geralmente suprime o crescimento de células tumorais, a maioria das células tumorais adquirem mecanismos de escape para inibir a sinalização a partir de TGF- β , o que inclui mutação de seu receptor e mutação de moléculas “Smad” que transmitem o sinal do receptor. Tax também inibe o sinal de TGF- β ligado a Smad2, 3 e 4 ou CBP/p300 (LEE et al., 2002; MORI et al., 2001). Inibição da sinalização de TGF- β permite que as células infectadas pelo HTLV I permaneçam incólumes ao efeito inibitório do crescimento de TGF- β .

Células leucêmicas de indivíduos com LLTA demonstram marcantes anormalidades cromossômicas, que provavelmente refletem instabilidade cromossômica. Tax interage com a proteína MAD1, que forma um complexo com MAD2 e controla o processo mitótico. O impedimento funcional de MAD1 causado pela proteína Tax gera instabilidade cromossômica, sugerindo o envolvimento desse mecanismo na oncogênese.

Como já bem demonstrado, vários estudos demonstram que Tax induz a proliferação contínua de células T e interage com ativadores sítio-específicos (FERREIRA et al., 1997). Como a expressão de GATA3 está correlacionada com o desenvolvimento de células T, a

desregulação da expressão desse gene pode ser um dos fatores envolvidos na fisiopatologia das doenças relacionadas à infecção pelo HTLV I.

2. O fator de transcrição GATA3

Os fatores de transcrição da família GATA são assim chamados por se ligarem com alta afinidade a seqüências consensuais de DNA 5' (A/T) GATA (A/G) 3' através de um ou dois domínios distintos de ligação “zinc-finger” altamente conservados de DNA da forma C-X₂-C-X₁₇-C-X₂-C (onde C é uma cisteína). (figura 2)

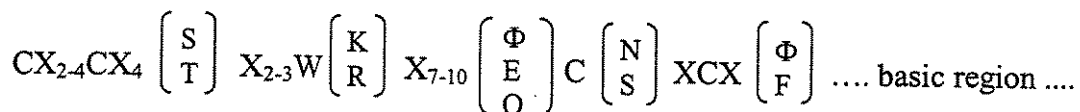


Figura 2: Estrutura do fator de transcrição GATA. Consenso de ligação ao DNA dos fatores de transcrição da família GATA, baseado no trabalho de Lowry e Atchley (LOWRY e ATCHLEY, 2000). Estão indicados os resíduos de aminoácidos altamente conservados. X representa um aminoácido qualquer, Φ os resíduos hidrofóbicos (A,V,L,I). Os 20 aminoácidos imediatamente após a seqüência do zinc-finger são altamente básicos, altamente conservados e necessários para a ligação ao DNA.

São encontrados em seres vivos eucariotas desde fungos e plantas até invertebrados e vertebrados. Demonstram papel crítico no desenvolvimento celular, incluindo regulação da diferenciação e controle da proliferação celular. Mutação ou modulação da expressão do gene podem estar envolvidas na fisiopatologia de doenças humanas.

A maioria de outras famílias de fatores de transcrição expandiu-se suficientemente para abranger dezenas, se não centenas, de membros individuais. Contraditoriamente, os fatores GATA evoluíram de forma muito mais restrita: apenas seis fatores foram identificados em vertebrados, três (possivelmente quatro) em *Drosophila* e onze no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (PATIENT e MCGHEE, 2002).

Cada membro da família GATA exibe um padrão de expressão distinto, freqüentemente sobreposto, em linhagens celulares e tecidos. O fator de transcrição

GATA1 é encontrado em células de linhagem eritróide e megacariocítica, em mastócitos derivados da medula óssea e em células progenitoras hematopoéticas (MARTIN et al., 1990). O fator de transcrição GATA2 também é expresso em células progenitoras, mastócitos, megacariócitos, células cerebrais primitivas, eritroblastos primitivos, células endoteliais, “stem cells” embrionárias e uma variedade de outras células e tecidos (DORFMAN et al., 1992; LEE et al., 1991). A expressão de GATA4 é restrita ao coração, epitélio intestinal, endoderma primitivo e gônadas (ARCECI et al., 1993).

O fator de transcrição GATA3 humano é uma proteína de 444 aminoácidos expressa de maneira temporalmente dinâmica que assume funções vitais durante o desenvolvimento embrionário (LIEUW et al., 1997). Inicialmente descrito como apresentando um restrito padrão de expressão, posteriormente evidenciou-se um acúmulo abundante em vários tecidos distintos durante o desenvolvimento incluindo placenta, rins e adrenal, sistema nervoso central e periférico embrionário e adulto, fígado embrionário e linfócitos T (GEORGE et al., 1994; OOSTERWEGEL et al., 1992; YAMAMOTO et al., 1990). GATA3 é o primeiro fator de transcrição necessário para os estágios iniciais do desenvolvimento de timócitos, mas não é essencial para o desenvolvimento de outras linhagens hematopoéticas, como células eritróides, macrófagos, linfócitos B ou granulócitos (TING et al., 1996). Assim sendo, a expressão de GATA3 é confinada a linfócitos T e células natural killer (NK) no sistema hematopoético. Até o momento foram identificados genes alvo que são regulados diretamente pelo GATA-3 apenas em linfócitos T (GEORGE et al., 1994; HENDRIKS et al., 1999; OOSTERWEGEL et al., 1992).

Dados atuais sugerem que GATA3 funciona como um ativador transcricional de unidades de transcrição específicas de células T, como os genes de receptores de células T (TCR) α , β e δ e o gene CD8 α (HO et al., 1991; JOULIN et al., 1991; KO et al., 1991; LANDRY et al., 1993; MARINE e WINOTO, 1991; YANG e ENGEL, 1993). O gene lactogêneo placentário I também pode ser um gene alvo para o GATA3 na placenta (JACQUEMIN et al., 1994). Todos esses genes contêm sítios GATA em regiões de promotores ou facilitadores (“enhancers”) funcionalmente definidos (KO et al., 1991).

Recentemente, tem sido demonstrado que GATA3 desempenha um papel instrutivo direcionando a diferenciação Th2 (FARRAR et al., 2001). A expressão do gene GATA3 é necessária para o desenvolvimento dos primeiros precursores de células T (HATTORI et al., 1996; HENDRIKS et al., 1999; TING et al., 1996). Os níveis de GATA3 são baixos durante as duas fases de rearranjo do gene de TCR (receptores de células T), mas são altos no período intermediário de células rapidamente proliferativas que separa essas duas fases. A expressão de GATA3 permanece alta em timócitos CD4+, mas progressivamente diminui em timócitos CD8+. GATA3 é detectado em células T CD4+ primárias e os níveis de expressão aumentam substancialmente durante a diferenciação Th2 (ZHANG et al., 1997; ZHENG e FLAVELL, 1997). A expressão de GATA3 tem sido demonstrada como indispensável para o desenvolvimento de Th2 e é inibida em resposta à ativação de Stat4 mediada por IL-12 (OUYANG et al., 1998; ZHENG e FLAVELL, 1997). GATA3 ativa fortemente o promotor de IL-5, mas parece ter apenas efeito limitado na transcrição do gene de IL-4 (RANGANATH et al., 1998; ZHANG et al., 1998; ZHENG e FLAVELL, 1997). A introdução retroviral de GATA3 durante a diferenciação *in vitro* de células primárias CD4+ em Th1 resultou em inibição da produção de IFN- γ , independente de IL-4 (FERBER et al., 1999; OUYANG et al., 1998), e em inibição de IL-12R β 2, o que normalmente acompanha a diferenciação Th2 (SZABO et al., 1997). A manipulação de Stat6 e a expressão de GATA3 em culturas de polarização Th1 e Th2 *in vitro* resultou em uma maior compreensão das bases moleculares da diferenciação Th1/Th2. Entretanto, há poucos dados disponíveis sobre o papel do GATA3 durante as respostas imunes em modelos animais.

2.1. Estrutura e expressão do gene GATA3 humano

2.1.1. A estrutura

A unidade transcricional GATA3 humana está contida em 17 kb de DNA genômico e se divide em seis exons (figura3). O sequenciamento de clones genômicos de GATA3 humano mostrou que a região não translada 5' do RNAm é separada por um intron. O códon de iniciação ATG se encontra 370 nucleotídeos abaixo da primeira junção 3' intron-exon, e os dois domínios de ligação de DNA "zinc finger" do GATA3 são codificados por

Introdução

dois exons separados (IV e V) de tamanhos semelhantes (140 e 120 bp, respectivamente). É interessante observar que ambos os exons codificadores dos “zinc finger” do GATA3 estão ligados em posições semelhantes às suas contrapartes em GATA1. À exceção do primeiro intron curto de 394 bp, os exons II a VI são separados um do outro por seqüências de introns de 4 a 5 kb. As seqüências de todas as junções intron-exon estão em concordância com as seqüências consensuais.

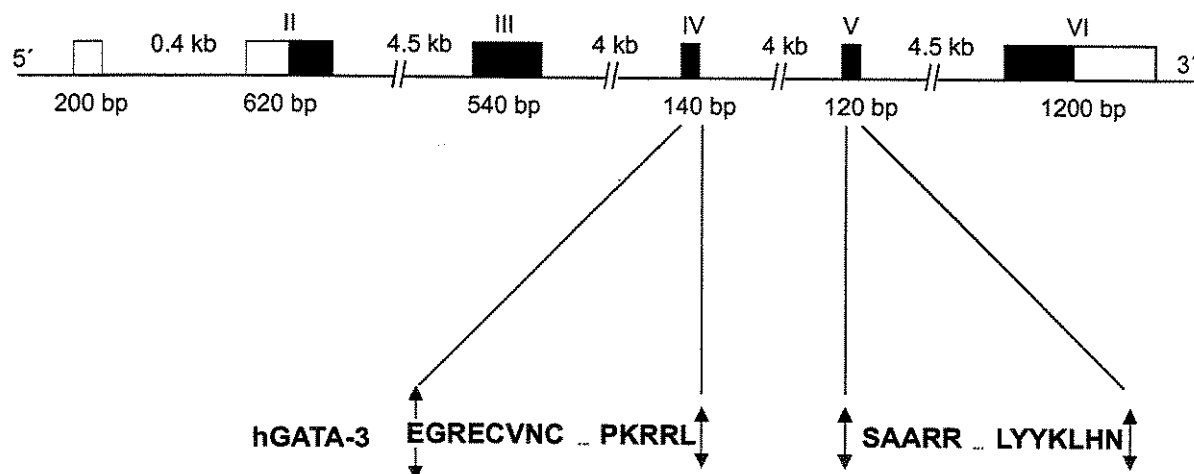


Figura 3: Estrutura do gene GATA3 humano. Estão apresentados a localização e o tamanho dos seis exons e dos cinco introns do gene GATA3 humano. As caixas abertas representam as regiões não codificadoras. A seqüência de aminoácidos dos exons IV e V, que codificam as regiões “zinc-finger”, também estão representados (LABASTIE et al., 1994).

O seqüenciamento do promotor do gene GATA3 demonstrou alto conteúdo de GC com numerosos locais de ligação para o fator de transcrição Sp1 (BRIGGS et al., 1986) e a falta de caixas TATA e CAAT, como descrito para o gene GATA1 humano (HANNON et al., 1991; MANTOVANI et al., 1988; TSAI et al., 1991). Tais estruturas são encontradas habitualmente em promotores de genes constitucionalmente expressos (DYNAN et al., 1986), e também têm sido descritas em genes altamente regulados como o gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (ISHII et al., 1985), no protooncogene c-rel

(HANNINK e TEMIN, 1990) ou no fator de transcrição Ets-1 (JORCYK et al., 1991). Ao contrário de outros genes, como no GATA1.

2.1.2. Ativação transcricional.

Existem poucos relatos na literatura sobre o controle transcricional do gene GATA3. Talvez o principal estudo sobre esse tema tenha sido feito por Romeo (GREGOIRE e ROMEO, 1999), que inicialmente determinaram seqüências *cis*-acting localizadas próximo ao sítio de iniciação da transcrição e envolvidas na ativação do gene GATA3 humano. Subseqüentemente, mapearam, através da pesquisa de regiões de hipersensibilidade a Dnase I (HS), uma seqüência do gene GATA3, contendo o primeiro exon e a maioria do primeiro intron, compreendida entre as regiões -96 e + 598, que corresponde à região promotora mínima do GATA3 humano. Esse fragmento de nucleotídeos contém a região necessária e suficiente para a atividade eficiente do promotor do gene GATA3. O promotor contém vários sítios GGGCGG (BRIGGS et al., 1986) e variantes GGGAGG (JONES et al., 1986), potenciais sítios de ligação para a fator de transcrição Sp1.

2.1.3. Repressão transcricional.

Como já se sabe, a posição do silenciador de um gene, assim como de um “enhancer”, é variável dependendo do gene estudado e pode estar adjacente ou muito afastada da região promotora. O silenciador do gene GATA3 distancia-se 7 kb da extremidade 5' do promotor e pertence ao segundo grupo. Romeo, a partir de um estudo com regiões HS sobre a atividade transcricional do gene GATA3, localizaram um fragmento de DNA, localizado entre -8025 e -5900, que conferia especificidade ao promotor do gene na célula T. Precisamente, a região silenciadora foi identificada entre as regiões -7828 e -7121 do mesmo gene. Na análise de deleção desse silenciador, Romeo descreveram dois elementos “*cis*-acting”: um 5', que contém CAGGTG E-box e está localizado entre -7828 e -7121, e um elemento 3', que se localiza entre -7197 e -7121 e compreende um sítio de ligação YY1 adjacente a CAGGTG E-box (figura 4). Essas regiões são sítios de ligação de ZEB (“zinc finger E-box”), um repressor transcricional ativo que participa da regulação tanto da diferenciação muscular como da expressão do

gene da $\alpha 4$ -integrina durante a hematopoese (POSTIGO e DEAN, 1997; POSTIGO et al., 1997). O estudo da expressão de ZEB demonstrou que esse silenciador tem ação repressora no promotor do gene GATA3 em células não T. Demonstrou-se também que, em células T, E2A e HEB (na forma de um heterodímero) liberam a repressão de ZEB. Assim sendo, a atividade de ZEB é fundamental na diferenciação e função da célula T em vertebrados.



Figura 4: Sequência do silenciador do gene GATA3 humano. (GenBank TM/EBI Data Bank AJ 131811). O fragmento de DNA contendo a sequência silenciadora do gene GATA3 compreende as regiões -7828 a -7121.

O desenho do nosso estudo originou-se na constatação reportada por Pandolfi et al (PANDOLFI et al., 1995) de que camundongos nocauteados por recombinação homóloga para o gene GATA3 exibiam várias e graves anormalidades morfológicas e fisiológicas no sistema nervoso central e periférico, além de hematopoese ineficaz durante o desenvolvimento embrionário. Havia, portanto, correlação entre as anomalias apresentadas por camundongos deficientes do gene GATA3 e as manifestações clínicas evidenciadas nas doenças relacionadas à infecção pelo HTLV I em humanos tais como a paraparesia

espástica tropical/mieolopatia associada ao HTLV I (PET/MAH) e a Leucemia Linfoma T do Adulto (LLTA).

Como a expressão de GATA3 está relacionada ao desenvolvimento de células T, o comprometimento da expressão desse gene poderia ser um dos fatores envolvidos na fisiopatologia das doenças relacionadas à infecção pelo HTLV I.

Objetivos

O presente trabalho teve por objetivos:

1. Analisar a expressão do RNAm do gene GATA3 em indivíduos portadores do vírus HTLVI e em portadores das doenças secundárias à essa infecção viral, e compará-la a indivíduos normais.
2. Caracterizar as interações DNA-proteína entre as regiões de controle transcricional do gene GATA3, os fatores de transcrição celulares envolvidos nesse controle transcricional e o transativador do HTLVI denominado Tax.
3. Analisar a função da proteína Tax na regulação da expressão do gene GATA3.

Material e Métodos

3. RT-PCR semi quantitativo para análise de expressão do RNAm do gene GATA3 humano em indivíduos contaminados pelo HTLV I

3.1. Seleção dos indivíduos estudados

Para cumprir a primeira etapa do estudo, que compreende a análise da expressão do gene GATA3 em indivíduos normais e infectados pelo HTLV I, foram estudados 14 indivíduos, sendo: 4 doadores de sangue, portadores assintomáticos do vírus HTLV I; 2 pacientes portadores de leucemia/linfoma T do adulto; 1 paciente com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV I e 7 doadores de sangue saudáveis. Os doadores de sangue saudáveis e os portadores assintomáticos do vírus não apresentavam nenhum sinal ou sintoma atual ou história recente compatível com qualquer tipo de infecção, nem história pregressa de neoplasia ou uso recente de medicações. Todos os pacientes e doadores foram orientados e consentiram em participar do estudo.

3.2. Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo HTLV I foi feito inicialmente pela técnica de ELISA (Organon Teknika, Boxtel, the Netherlands) e confirmado pela técnica de Western Blot (HTLV I 2.4 Genelabs Diagnostics, Singapore) e/ou PCR. A amplificação do PCR foi feita usando-se os pares de primers SK110 e SK111 e o produto do PCR foi hibridizado com as sondas SK110 e SK188 marcadas com ³²P.

3.3. Quantificação CD4/CD8

A população de linfócitos T foi quantificada por análise de citometria de fluxo. As porcentagens de células positivas para cada anticorpo monoclonal foram definidas através da utilização de FACScan (Becton Dickinson ICS, Inc, Mountain View, CA). A quantificação de um portador assintomático e do paciente com PET/MAH não foi realizada.

3.4. Coleta de amostras

Foram coletados 20 ml de sangue venoso em 10% EDTA (sal di-sódico do ácido etilenodinitrotetracético) de cada indivíduo incluído no estudo, para extração do RNA.

Material e Métodos

3.5. Extração do RNA total e transcrição para cDNA

Foi feita a lise de hemáceas com tampão de lise NH_4Cl (0,144M) e NH_3HCO_3 (0,01M). O RNA total foi extraído de polimorfonucleares periféricos pelo método da guanidina isotiocianato fenol clorofórmio (CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987). A quantificação das amostras de RNA foi realizada através da leitura da densidade óptica em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260nm e 280 nm.

As amostras de RNA total extraídas foram transcritas reversamente em cDNA (híbrido RNA-cDNA) numa reação com volume final de 30 μl , contendo 4 μg de RNA total, 60 U da transcriptase reversa AMV (Amersham Life Science, Buckinghamshire, England), 5 μl de oligo dT (Life Technologies, Gaithersburg, USA), 6 μl de tampão da transcriptase reversa (250mM tris-HCl pH 8,3, 40mM MgCl_2 , 250 mM NaCl e DTT), 30 U de inibidor (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) e 3 μM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP. A reação foi incubada a 42°C por 60 minutos e a 52°C por 30 minutos sendo posteriormente precipitada com 3M de acetato de sódio pH 5,2 e etanol a -70 °C “overnight”.

3.6. PCR semi-quantitativo

O cDNA foi amplificado num mesmo tubo pela reação em cadeia da polimerase (PCR multiplex), usando-se as seqüências gênicas dos pares de primers PGATA3S e PGATA3AS do gene GATA 3 e dos pares de primers P β globinaS e P β globinaAS segundo tabela abaixo (Tabela 1).

O volume final da reação foi de 50 μl contendo 4 μl de cDNA, tampão 1x (200 mM tris-HCl pH 8,4; 500 mM KCl), 4,0 mM MgCl_2 , 100 μM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP, e 2,5 U Taq DNA polimerase (Life Technologies, Gaithersburg, USA).

A amplificação foi feita no ciclador automático de temperatura (Perkin Elmer- Cetus, Cetus Corp., Boston MA - USA). A desnaturação das amostras foi realizada a 94°C por 5 minutos e, em seguida, submetidas a 35 ciclos de amplificação a 92°C por 30 segundos para desnaturação, a 58°C por 30 segundos para “annealing” dos primers e a 72°C por 30

segundos para extensão. Para a padronização do número ideal de ciclos para a quantificação de RNAm de GATA3, as reações foram visualizadas , a cada 3 ciclos após o 20º ciclo, em gel de agarose. As bandas de GATA3 e β globina obtiveram efeito cumulativo e não haviam atingido o platô após 35 ciclos.

NOME	REGIÃO	SEQUÊNCIA
PGATA3S	1256-1276	5'AAGGCATCCAGACCAGAAAC3'
PGATA3AS	1339-1359	5'GTAAACGAGCTGTTCTTGGG3'
P β GLOBINAS	IVS-1	5'AGACAGAGAAGACTCTTG3'
P β GLOBINAAS	IV-2	5'TCATTCGTCTGTTTCCCATTTC3'

Tabela 1: Sequência dos primers para RT-PCR semi-quantitativo. Sequência utilizada para realização do PCR multiplex dos cDNA de GATA3 e β globina no ensaio de RT-semi quantitativo.

Os produtos obtido a partir do cDNA amplificado foram de 101 pares de bases para GATA3 e 404 pares de bases para β globina e visualizados gel de agarose a 1,6%.

A quantidade relativa de RNAm de GATA 3 e β globina foi calculada por densitometria através do “escaneamento” das bandas usando-se o programa EagleSight Stratagene, versão 3,2 (La Jolla, USA).

4. Análise da interação DNA-proteína

Como já descrito em vários trabalhos, a proteína Tax não se liga diretamente ao DNA, mas utiliza fatores de transcrição celulares para promover a interação com o DNA do hospedeiro. Assim sendo, para verificar-se a possibilidade de interação entre o transativador viral e as regiões de controle transcricional do gene GATA3, utilizamos o método de análise de retardamento do DNA em gel ou *gel-shift*. Desta forma, sequências específicas da região promotora e silenciadora foram marcadas com fósforo radioativo ^{32}P e utilizadas na reação de ligação com a proteína purificada Tax, tanto com o fator de transcrição Sp1 como com o silenciador ZEB. A análise foi feita após a realização de eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas ligadas ao DNA e resultou no retardamento da mobilidade do DNA.

Material e Métodos

4.1. Construção das sondas das regiões promotora e silenciadora

A região promotora contém 5 sítios de ligação para o fator de transcrição Sp1, sendo escolhidos dois deles para estudo. Os oligonucleotídeos complementares denominados GATA3Prom1 e GATA3Prom2, com 23 e 32bp respectivamente, e seus complementares estão representados na tabela 2 (GenBank número X73519). Para o estudo da região repressora do gene, foi usado um oligonucleotídeo contendo o sítio de ligação para ZEB, denominado GATA3Sil1, inserido na região entre -7121 e -7130 (GenBank número AJ131811) e está também representado na tabela 2 com seu complementar.

Para a reação de competição utilizou-se o competidor relacionado, ou seja, a mesma sequência das sondas anteriores, porém não marcadas e com excesso molar de 100 vezes.

NOME	REGIÃO	SEQUÊNCIA
GATA3Prom1	-188 e -174	5'-CCGGTCAGTGGAGGGGCGGGAGGAG-3' 3'-GGCCAGTCACCTCCCCGCCCTCCTC-5'
GATA3Prom2	-161 e -129	5'-CGGGGGTGC GCGGGGCGGGGGAGAAGTCCTG-3' 3'-GCCCCCACGCGCCCGCCCCCTCTTCAGGAC-5'
GATA3Sil1	-7121 e -7143	5'-AGCTTTTACCAGGTGGTCTCT-3' 3'-TCGAAAAATGGTCCACCAGAGA-5'

Tabela 2: Sondas para o ensaio de gel-shift. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados como sondas no ensaio de gel-shift no estudo da interação entre o promotor do gene GATA3 e seu silenciador. As sequências GATA3Prom1 e GATA3Prom2 são as sequências do promotor do gene e as regiões sublinhadas são os locais de ligação de Sp1. A sequência GATA3Sil1 é a sequência do silenciador com ligação para ZEB (sublinhado).

4.2. Marcação da sonda com isótopo radioativo

Anelaram-se 10ug de cada oligonucleotídeo com sua fita complementar em TrisHCl 10mM, MgCl 10mM , NaCl 50mM e DTT 1mM por 15 minutos a 65°C. Marcou-se 0,1ug de cada sonda anelada com γ -³²P utilizando-se a enzima T4 poliquinase (Life-

Technologies, Gaithersburg, USA), sendo então purificada em coluna sephadex G-25 (Amersham Biosciences, Roosendaal, Nederland) para retirada do isótopo não incorporado.

4.3. Proteína Tax, Sp1 e o vetor de expressão da proteína ZEB

A proteína purificada Tax foi fornecida por Susan J. Marriott (National Cancer Institute, Bethesda, MD, EUA) e o fator humano recombinante Sp1 foi obtido da Promega (Promega, Wisconsin, EUA). O plasmídeo de expressão p92pGex-Nil-2-a, construção com o vetor de expressão codificador da região codificadora dos aminoácidos 839 a 1125 da porção C-terminal da proteína ZEB humana que contém seu zinc-finger, foi fornecido pelo Dr Thomaz Brabletz (Universidade de Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Alemanha). Após a transformação e extração do DNA plasmidial (itens 4.3.1. e 4.3.2), realizou-se a digestão dupla com as enzimas BamHI / Xho para confirmação da presença do inserto.

4.3.1. Transformação

Para confirmação da presença e especificidade do vetor enviado foi utilizada a técnica de transformação em bactéria competente *Escherichia coli* (DH5 α) por choque térmico, a qual consiste em incubar-se 1 μ l do vetor com 50 μ l de bactéria competente por 30 minutos em gelo, seguindo-se a incubação por 45 segundos a 42°C e, novamente, por 2 minutos em gelo. Foram, então, acrescentados 950 μ l de meio SOC (Tryptone 2%, Extrato de Levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM, MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM e glicose 20mM) com ampicilina (50mg/ml-Sigma), incubando-se por 1 hora a 37°C sob agitação contínua de 230 r.p.m. Após esse período, acrescentaram-se 4 ml de SOC com ampicilina e a cultura foi mantida a 37°C sob agitação contínua de 230 r.p.m. “overnight”. No dia seguinte, esta cultura foi submetida à técnica de extração de DNA plasmidial.

4.3.2. Extração do DNA plasmidial

A técnica de extração de DNA plasmidial sob a forma de mini ou maxipreparação (rendimento de até 30 μ g e até 500 μ g, respectivamente) foi realizada utilizando-se o kit de Extração de DNA plasmidial Life-Concert (Life-Technologies, Gaithersburg, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A técnica consiste em promover lise alcalina da

bactéria, com conseqüente ligação do DNA plasmidial a uma coluna de resina aniônica e posterior remoção do RNA, proteínas e outras impurezas através de sucessivas lavagens em meio com média concentração de sal. O DNA plasmidial é, então, eluído com tampão rico em sal e precipitado com isopropanol. A concentração e qualidade do DNA serão determinadas em espectrofotômetro a 260 e 280 nm, em luz ultravioleta e/ou gel de agarose a 1%.

4.3.3. Extração da proteína ZEB

Após a confirmação da presença e especificidade do vetor enviado, a proteína de fusão GST foi obtida através da técnica modificada de purificação de proteína GST (Amersham Biosciences, Roosendaal, Nederland). Para tanto foi realizada a inoculação da bactéria *E.coli* DH5 α transformada com o vetor de expressão em 100 ml de meio LB (Tryptone 1%, Extrato de Levedura 0,5%, NaCl 10mM, ágar 15g/L) com ampicilina (50mg/ml-Sigma), e induzida com 1mM de IPTG por 4 horas. As células foram, então, centrifugadas a 2000 r.p.m. por 10 minutos à temperatura ambiente para obtenção do precipitado bacteriano. O precipitado foi lavado com 2 ml de tampão de lise contendo 100 mM de EDTA, 1% de triton X100, 0,5 mM de PMSF, 2 μ g/ml de aprotinina e 0.5 μ g/ml de leupeptina. O lisado foi posteriormente submetido a três ciclos de gelo e degelo e centrifugado a 4°C por 10 minutos a 2500 r.p.m., recolhendo-se, então, o sobrenadante. A seguir, foram adicionados 250 μ l de glutathione-sepharose 4B (Amersham Biosciences, Roosendaal, Nederland) ao sobrenadante, mantendo-se sob agitação constante por 30 minutos a 4 °C, lavando-se, em seguida, 1 vez com 1 ml do mesmo tampão de lise e 4 vezes com 1ml de PBS e EDTA. Para a eluição da proteína, adicionaram-se à sepharose 0.2 ml de tampão de eluição (50 mM Tris pH 8.0, 15mM glutathione reduzida e 0.1% de NP 40), com posterior centrifugação a 2000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C. A proteína resultante foi, então, analisada em gel SDS a 10% corado pelo azul de comassie. Alíquotas foram estocadas a -80 °C. A concentração protéica da amostra foi analisada por leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 280 nm e pela técnica de Bradford (Bio-Rad, Richmond, CA).

4.4. Anticorpos anti-Tax e anti-ZEB

O anticorpo anti-Tax foi fornecido pela Dra. Susan Marriot (National Cancer Institute, Bethesda, MD, EUA) e o anticorpo anti- ZEB foi fornecido pelo Dr. Thomaz Brabletz (Universidade de Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Alemanha).

4.5. Reação de ligação

Incubaram-se 50.000 cpm das sondas GATA3Prom1, GATA3Prom2 e GATA3Sil1 com a proteína Tax (0.9 µg) na presença ou não de Sp1 (1 unidade footprinting) ou ZEB (1.0 µg) e tampão de ligação (40mM Tris-HCl pH 7.9, 100mM NaCl, 20% glycerol, 0.2mM DTT), juntamente com 1.6µg de poli dI-dC (ácido poly-deoxy-inosinic-deoxy-cytidilico , Pharmacia, Piscataway, NJ) por 15 minutos em temperatura ambiente, num volume final de 14 µl de reação. Para o estudo da competição, foi usado o excesso molar de 100 vezes do competidor relacionado não marcado antes da adição das sondas marcadas. Para o experimento de supershift, os anticorpos anti-Tax e anti-ZEB foram adicionados à reação e incubados por 15 minutos.

As ligações realizadas estão esquematizadas nas tabelas 3 e 4.

Reação	1	2	3	4
SM	+	+	+	+
Sp1	–	+	+	+
Tax	+	+	+	+
Competição	–	–	+	–
anti-Tax	–	–	–	+

Tabela 3: Esquema das reações de ligação entre o promotor do gene GATA3 e Tax. A ligação ocorreu entre a sonda anelada (GATA3 Pro1) correspondente à região -188 a -174 do promotor do gene GATA3 e a proteína Tax. Para o estudo de competição foi usado um excesso molar de 100 vezes da sonda anelada não marcada. SM: sonda marcada; Anti-Tax: anticorpo anti-Tax. Esquema idêntico foi usado para a sonda anelada GATA3Pro2 que compreende a região -161 e -129.

Material e Métodos

Reação	1	2	3	4	5
SM	+	+	+	+	+
ZEB	-	+	+	+	+
Tax	+	+	+	+	+
Competição	-	-	+	-	-
Anti ZEB	-	-	-	+	-
Anti-Tax	-	-	-	-	+

Tabela 4: Esquema das reações de ligação entre o silenciador do promotor do gene GATA3 e Tax. Esquema das reações de ligação entre a sonda anelada ZEBSil1 e a proteína Tax. Para o estudo de competição, foi usado um excesso molar de 100 vezes da sonda anelada não marcada. SM:sonda marcada; Anti-Tax:anticorpo anti-Tax; Anti-ZEB:anticorpo anti-ZEB.

4.6. Análise da interação DNA-proteína

A leitura da interação DNA-proteína foi feita através de corrida da reação em gel de eletroforese (policrilamida a 4%), 250V por 1 hora. O gel é colocado em papel filtro e exposto ao filme de RaioX com intensificador por 24 horas. Quando ocorre a interação do DNA com a proteína, há retardamento da mobilidade do DNA e formação de uma banda visualizada no filme de RaioX.

5. Análise de expressão gênica através do estudo funcional

5.1. Construções

5.1.1. Construção -96/+598pBLCAT3

Para o estudo *in vitro* da atividade do promotor do gene GATA3 na presença da proteína Tax, optamos por avaliar o efeito da proteína Tax tanto no promotor do gene como em seu silenciador. Para isso, obtivemos do prof Paul-Henri Romeo (GREGOIRE e ROMEO, 1999) a construção com o promotor mínimo do gene GATA3 que contém a região -96/+598 e por nós denominada -96/+598pBLCAT3, inserida no vetor pBLCAT3 (ATCC, Manassas, VA) representada na figura 5.

Material e Métodos

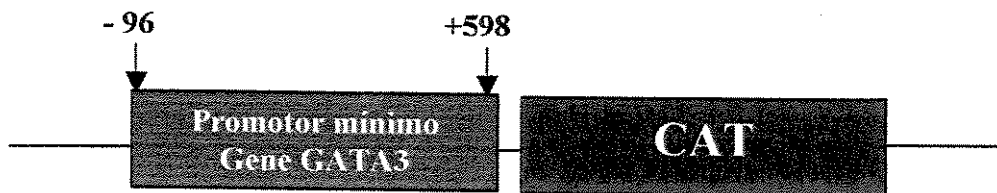


Figura 5: Representação da construção com o promotor mínimo do gene GATA3. Diagrama da construção contendo o promotor mínimo do gene GATA3 num vetor pBLCAT3. O promotor mínimo compreende as regiões -96 e +598, sendo +1 o início do primeiro intron. Essa sequência está inserida acima do gene codificador da enzima cloranfenicol acetiltransferase (CAT)

5.1.2. Construções pWTax e pV89A

Fatores de transcrição mutantes de domínio negativo transitoriamente transfectados em modelos vivos como células permitem estimar a participação de um fator de transcrição em um processo celular, desde que o tipo celular possa ser eficientemente transfectado e o processo celular considerado não exceda três dias.

Com o objetivo de se identificar regiões funcionais de interação com Sp1 e ZEB, foi solicitado ao prof Chou-Zen Giam (Uniformed Services University of Health Sciences, Bethesda, Maryland) que nos enviasse uma construção com um sítio de mutação da proteína Tax. Chou-Zen Giam (HARROD et al., 1998) descreveu a análise de uma série de mutações por deleção da proteína Tax. Seus estudos revelaram que os resíduos dos aminoácidos entre as posições 81 e 95 (₈₁QRTSKTLKVLTPPIT₉₅) dessa proteína são importantes para ligação CBP/p300. Essa região está entre os domínios de ligação de CREB bZip e para dimerização da proteína Tax (ADYA e GIAM, 1995; TIE et al., 1996). Três resíduos de aminoácidos dessa região (₈₈KVL₉₀) constituem sítios que são rapidamente clivados por tripsina e quimotripsina, sugerindo que são altamente expostos à interação protéica. Uma série de mutações de ponto dessa região resulta em prejuízo na transativação de LTR viral e forma proteínas comprometidas na interação com CBP/p300.

O prof. Chou-Zen Giam nos enviou um plasmídeo de expressão da proteína Tax na forma “wild-type” (WT) e o mutante V89A com a mutação no resíduo 89.

Todos os vetores utilizados nesse estudo foram submetidos à técnica de transformação e maxipreparação (4.3.1 e 4.3.2.), com posterior digestão para confirmação da sua presença.

5.1.3. Construção do vetor pSIL-GATA3 que contém a região silenciadora do gene GATA3

A construção contendo o silenciador do gene GATA3, por nós denominada pSIL-GATA3, foi realizada inserindo-se a sequência silenciadora, que compreende as regiões – 7828 a –7121, 5', à região -96 a + 598 do promotor mínimo da construção - 96/+598pBLCAT3.

5.1.3.1. Extração de DNA genômico

Foram coletados 10ml de sangue com EDTA e centrifugados a 3.000 r.p.m. por 15 minutos para separação e retirada do plasma. As hemácias foram, em seguida, lisadas pela adição de 40ml de solução de NH_4Cl 0,144M e NH_4HCO_3 0,01M (proporção 10:1) e centrifugadas por 15 minutos, para decantação dos leucócitos, por 2 vezes, para se obter uma massa de leucócitos livre de hemácias.

O conglomerado de leucócitos foi, então, dissolvido em 10ml de solução contendo NaCl 0,3M, EDTA 10mM, Tris/HCl pH7,5 10mM, Uréia 7M, SDS 0,5% e incubado a 37°C por aproximadamente 16hs.

Após a incubação, adicionaram-se 10ml de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1 e centrifugou-se à 3000 r.p.m. por 15 minutos. O sobrenadante foi posteriormente transferido para um novo tubo, com cuidado para não levar a interfase composta de proteínas. Repetiu-se o procedimento mais duas vezes, sendo que, na última vez, foram adicionados apenas clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1. Ao sobrenadante foram adicionadas 2,5 vezes o volume de etanol absoluto gelado com 10% de acetato de sódio 3M para precipitação do DNA.

O DNA precipitado foi lavado com etanol a 70% para se eliminar resíduos de fenol e sal e deixado em temperatura ambiente para secar. Uma vez seco, o DNA foi diluído em água deionizada estéril e guardado a -20°C até ser utilizado.

5.1.3.2. Amplificação da região silenciadora por PCR

Os primers pSIL1 e pSIL2 (tabela5) delimitam a região de 954 pb (-7928 a -6963) que contém a sequência do silenciador do gene GATA3 (figura 4).

NOME	REGIÃO	SEQUÊNCIA
PSIL1	-7928 a -7907	5'-GCCCTGAGCATTGTTTGGTAG-3'
PSIL2	-6984 a -6963	5'-GTTAGTGTGAGGTCGAGGATC-3'

Tabela 5: Sequências dos primers utilizados no PCR da região silenciadora.

Essa sequência foi amplificada através de uma amostra de DNA genômico, utilizando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Cerca de 1µl de DNA foi amplificado em 5µl de tampão, 1µl de dNTP 10mM, 2µl de MgCl₂ 50mM, 10µM do primer pSIL1 e pSIL2, 1 unidade de Taq DNA polimerase e água deionizada estéril suficiente para 50µl de volume final (todos reagentes fornecidos pela Gibco-BRL). O PCR foi realizado em termociclador automático (Perkin Elmer Thermo-cycler, Connecticut, EUA) por 35 ciclos, a 94 °C por 2 min para desnaturação, em temperatura de anelamento de 54°C por 60 segundos e extensão de 68°C por 2 minutos. O programa encerrou-se com 7 minutos de extensão final.

Os produtos da reação foram visualizados em gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com brometo de etídio (5µg/dl), sob luz ultravioleta com amplificação de fragmentos de 954pb.

5.1.3.3. Clonagem do fragmento amplificado no vetor TA

O fragmento contendo o silenciador do promotor do gene GATA3, amplificado por PCR e apresentado no item anterior, foi ligado ao vetor PCR®2.1 (Original TA Cloning ® Kit-Invitrogen) usando-se o kit T4 DNA Ligase (Invitrogen-Life Technologies) e sub-

Material e Métodos

clonado em células *E.coli* competentes (Subcloning Efficiency® DH5α™ Competent Cells-GIBCO BRL) usando-se a técnica de transformação de bactéria competente *Escherichia coli* (DH5α) descrita anteriormente no item 4.3.2.

Após essa etapa, o meio foi centrifugado a 10.000 r.p.m. por 30 segundos e 900μl do sobrenadante foram retirados, sendo o precipitado de bactérias resuspendido nos 100 μl restantes do meio e espalhado em placa de Petri, contendo meio LB sólido (Tryptone 1%, Extrato de Levedura 0,5%, NaCl 10mM, ágar 15g/L), ampicilina (50mg/ml-Sigma) e solução IPTG 100mM, para seleção de colônias que contivessem o inserto (fragmento de PCR).

A placa de Petri foi incubada, então, por 14 a 16 horas em estufa a 37 °C.

5.1.3.4. Extração do DNA plasmidial

Após seleção das colônias vermelhas da placa de Petri, as mesmas foram transferidas para 3ml de meio LB com ampicilina e deixadas sob agitação por 16hs a 37°C. A cultura foi em seguida centrifugada a 6.000 r.p.m. por 15 minutos, a fim de recolher-se o precipitado bacteriano.

A extração do DNA das colônias positivas foi feita usando-se o QIAprep® Miniprep Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan), de acordo com as instruções do fabricante.

A concentração e qualidade do DNA foram determinadas em espectrofotômetro a 260 e 280 nm, em luz ultravioleta e/ou gel de agarose a 1%.

A seguir, o vetor foi digerido com as enzimas Hind III e XbaI para isolamento do inserto, e o plasmídeo contendo o promotor mínimo foi digerido, para sua linearização, com as enzimas Hind III e XbaI.

5.1.3.5. Clonagem do vetor contendo o silenciador

Ambos os fragmentos digeridos foram extraídos do gel de agarose a 1,0% usando-se o QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) e purificados com a utilização do kit de extração de DNA do gel da Concert-Life, segundo instruções do fabricante. A seguir, o vetor linearizado foi ligado ao inserto produzido, usando-se novamente a T4 DNA

Material e Métodos

Ligase. A ligação foi feita com a utilização de 0,5µl da enzima T4 ligase (Gibco-BRL), tampão da enzima e, aproximadamente, 30ng do vetor -96/+598pBLCAT3 para 10ng do inserto (silenciador do gene GATA3). A reação foi incubada a 14°C por aproximadamente 16hs.

O produto da ligação foi usado na transformação da bactéria competente DH5α e transformada como descrito no item 4.3.2.

A seguir, foram realizadas a extração do DNA plasmidial (item 5.1.3.4.) e o seqüenciamento automático dessa construção.

5.1.3.6. Seqüenciamento

O seqüenciamento automático foi realizado no seqüenciador ABI prism 377 DNA sequencer ® (Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit Version 2.0-Applied Biosystems).

O princípio do seqüenciamento baseou-se no método de Sanger (SANGER et al., 1977), porém, ao invés de marcador radioativo, utilizou-se o marcador de fluorescência *bigdye*.

Para a reação de seqüenciamento misturaram-se 1.6 pmol de cada primer (tabela 6), 1µl de *bigdye*, 20ng de DNA e água estéril para 10µl de volume final, submetendo-se por 2 minutos a 94°C para desnaturação inicial e, posteriormente, a 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturação, por 30 segundos a 53°C para anelamento e por 4 minutos a 60°C para extensão. Os dois primers foram desenhados de modo a seqüenciar os limites entre as junções pBLCAT3/silenciador e silenciador/promotor mínimo.

Os fragmentos marcados foram aplicados em um gel de acrilamida e submetidos a um campo elétrico, onde foram separados por tamanho. Ao passar pela região de leitura, o laser excita o corante fluorescente que emite luz em um comprimento de onda específico para cada base. Esses dados são passados pelo computador que emite os resultados em forma de um gráfico (eletroesferograma), onde cada cor representa um nucleotídeo: G, A, T ou C.

NOME	REGIÃO	SEQUÊNCIA
pSIL3	-7726 a -7706	5'-CCAAAGGAAGACAAGAACGG-3'
PSIL4	-7126 a - 7144	5'-CCGAATGCTAGAGGACAG-3'

Tabela 6: Sequências dos primers para sequenciamento da construção pSIL-GATA3. Primers utilizados para o sequenciamento da construção que contém o silenciador do gene GATA3.

Uma vez garantida a sequência das construções, seja por digestão ou por sequenciamento, as mesmas foram submetidas à técnica de maxipreparação a fim de obter-se uma maior quantidade de DNA plasmidial para a realização das transfecções. A bactéria transformada contendo o DNA plasmidial cresceu em 500ml de meio LB e procedeu-se à extração do DNA plasmidial pela técnica de maxipreparação (item 5.1.3.4.).

5.2. Transfecção transitória

5.2.1. Linhagem celular

A linhagem celular escolhida para abrigar a construção transfectada foi a linhagem Jurkat obtida da ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Essa linhagem de linfoblastos humanos contém a maquinaria celular da célula T. Essas células foram cultivadas em RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) suplementado com 10% soro bovino fetal (SBF), 50 µg/ml de gentamicina e 2mM L-glutamina, e incubadas em estufa a 37⁰ C a 5% CO₂.

5.2.2. Eletroporação

O método de eletroporação tem sido usado para a introdução de DNA em uma grande variedade de células de animais, plantas e bactérias. A eficiência da transfecção por eletroporação é influenciada por alguns fatores como a extensão do campo elétrico aplicado, o tempo de choque aplicado, a temperatura, a conformação e a concentração de DNA e a composição iônica do meio.

No método de eletroporação (PAHL et al., 1991) a célula é exposta a um pulso elétrico breve, que produz poros temporários na membrana celular, permitindo a entrada do DNA plasmidial exógeno.

A técnica consistiu em lavar as células, que permaneciam crescendo em fase exponencial, com RPMI sem soro bovino fetal, ressuspendê-las em meio RPMI – 1640 e transferi-las para uma cubeta de eletroporação de 0,4 gap com adição do DNA plasmidial a ser testado. A seguir, a cubeta permaneceu a temperatura ambiente por 5 minutos e submeteu-se a célula à eletroporação em equipamento BioRad gene pulser II com os seguintes parâmetros: 5×10^6 células, voltagem de 0,25kV e capacitância de 975 μ F, por 17mseg com 30 μ g de DNA plasmidial total. Os parâmetros para a eletroporação foram obtidos após padronização e forneceram resultados consistentes e reprodutíveis para o tipo celular usado. A cubeta foi então, colocada no gelo por 10 a 15 min e, após esse tempo, as células foram transferidas para placa com 10ml de meio RPMI - 1640 e 10% de SBF e incubadas por 48 horas a 37⁰C com 80% de umidade e 5% de CO₂ antes de serem analisadas.

A tabela abaixo (tabela 7) sumariza as associações entre os plasmídeos transfectados e suas concentrações:

Construção	Concentração
pBLCAT3	30 μ g
pBLCAT3 / pWTax	20 μ g / 10 μ g
-96/+598pBLCAT3 / pBLCAT3	20 μ g / 10 μ g
-96/+598pBLCAT3 / pWTax	20 μ g / 10 μ g
-96/+598pBLCAT3 / PV89A	20 μ g / 10 μ g
pSIL-GATA3 / pBLCAT3	20 μ g / 10 μ g
pSIL-GATA3 / pWTax	20 μ g / 10 μ g
pSIL-GATA3 / pV89A	20 μ g / 10 μ g

Tabela 7: Associações de plasmídeos para transfecções transitórias. Os plasmídeos co-transfectados e suas respectivas concentrações. As associações representadas visam a avaliação da atividade basal do vetor pBLCAT3 vazio, a influência da proteína Tax sobre ele (pBLCAT3

/ pWTax) e as construções com o promotor mínimo e o silenciador (-96/+598pBLCAT3 e pSIL-GATA3 repectivamente) na presença ou não da proteína Tax (pWTax) ou seu mutante (pV89A). Todas as transfecções apresentam concentração final de DNA total de 30 µg.

5.2.3. Lise celular

Após o período de 48 horas, as células que permaneciam em cultura foram coletadas e centrifugadas a 1200 r.p.m., a 4⁰C por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS. A seguir, acrescentaram-se 800µl de tampão de lise e a mistura permaneceu à temperatura ambiente por 30 minutos. Foram, então, centrifugadas a 14000 r.p.m. a 4⁰ C por 10 minutos. 200µl do lisado celular foram submetidos ao teste ELISA e 4 outras alíquotas foram congeladas em congelamento rápido (gelo seco/etanol) para posterior quantificação protéica.

5.2.4. Imunoensaio enzimático colorimétrico (Enzyme linked immunosorbent assay- E.L.I.S.A.)

Todas as construções utilizadas nesse estudo contêm o gene repórter codificador da enzima cloranfenicol acetil transferase. Essa enzima é codificada por um gene bacteriano de resistência ao cloranfenicol, que inativa esse antibiótico através de sua acetilação. Esse gene não é encontrado em células eucariontes e, portanto, não existe uma atividade basal dessa enzima nas células estudadas.

O gene CAT é capaz de produzir a cloranfenicol acetiltransferase quando ativado por um inserto clonado acima de seu sítio de iniciação da transcrição. Portanto, a determinação da atividade da enzima CAT é uma medida indireta da atividade do gene (inserto) em estudo.

Tradicionalmente, a atividade de CAT é medida utilizando-se métodos radioativos. Entretanto, a determinação dos níveis de CAT utilizando-se o método de ELISA evita o uso de isótopos radioativos mantendo a mesma sensibilidade. O princípio do teste é baseado no ensaio de um ELISA “sandwich”. Anticorpos anti CAT são aderidos à superfície de microplacas e a adição do extrato celular total contendo a enzima CAT faz com que ocorra uma reação antígeno/anticorpo. A seguir, adiciona-se um anticorpo anti-CAT marcado com

Material e Métodos

digoxigenina. A adição de um anticorpo anti-DIG-POD faz com que se adicione uma peroxidase à digoxigenina. A adição do substrato da peroxidase chamado ABTS induz a uma reação colorimétrica (figura 6).

O método escolhido para determinação da quantidade da enzima CAT foi CAT-ELISA (Boehringer-mannheim GmbH Ottweiler, Germany). A determinação final da enzima CAT foi feita através da relação entre a densidade optica encontrada em cada determinação do ELISA e sua concentração proteica total. Cada ensaio foi realizado no mínimo três vezes em triplicata.

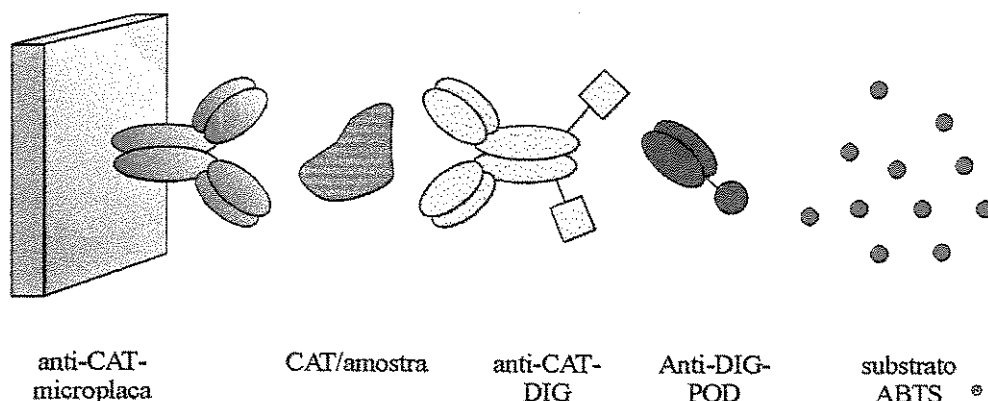


Figura 6: Representação da técnica ELISA “sandwich”. ELISA para determinação da quantidade da enzima cloranfenicol acetil transferase presente no lisado celular. Anti-CAT: anticorpo anti-cloranfenicol acetil transferase aderido à microplaca. Anti-CAT-DIG: anticorpo anti-cloranfenicol acetil transferase aderido à digoxigenina. Anti-DIG-POD: anticorpo anti-digoxigenina aderido à peroxidase. ABST: substrato da peroxidase.

5.2.5. Determinação protéica do extrato celular.

O método ELISA preconiza a normalização da concentração de CAT através da concentração proteica total do extrato celular.

A determinação da concentração de proteínas totais foi realizada pelo método do BCA Protein Assay Reagent Kit ® (Pierce, Rockkford, IL), segundo instruções do *Material e Métodos*

fabricante. O método combina a redução de Cu^{+2} para Cu^{+1} pela proteína em meio alcalino, sendo compatível com tampões detergentes. As amostras testadas para a quantificação protéica foram descongeladas progressivamente a 4°C.

Resultados

6. Análise da expressão do RNAm do gene GATA3

6.1. Quantificação CD4/CD8

A quantificação de linfócitos T totais CD4/CD8 demonstrou uma distribuição relativamente homogênea presente nas amostras testadas, entre doadores de sangue saudáveis e portadores assintomáticos. Entretanto, existe uma evidente proliferação de células T (evidenciadas como CD4+ pela citometria de fluxo) em pacientes com LLTA. As análises de um portador assintomático e do paciente com PET/MAH não foram feitas (tabela 8).

Indivíduo	Total célulasT (CD3/CD4 + CD3/CD8) – por mm ³ *
DS1	1422
DS2	1090
DS3	1798
DS4	1351
DS5	1053
DS6	1027
DS7	2224
PA1	1285
PA2	1106
PA3	957
LLTA 1	8920
LLTA 2	308352

Tabela 8: Quantificação da população de linfócitos T. Os valores expressos indicam a quantidade, em valor absoluto, de células CD3/CD4 + CD3/CD8 em doadores saudáveis (DS), portadores assintomáticos (PA) e pacientes com Leucemia Linfoma T do adulto (LLTA). Os valores normais da contagem de células T estão entre 800-2300/mm³.

Resultados

6.2. RT-PCR semi-quantitativo

A expressão do RNAm do gene GATA3 foi verificada através da técnica de RT-PCR semi-quantitativo, que determinou a relação entre o RNAm deste fator de transcrição e o RNAm da β globina (figura 7). O resultado demonstra de maneira clara que, quando comparados a indivíduos saudáveis, os pacientes infectados pelo HTLVII apresentam diminuição da expressão do gene GATA3, tanto os portadores assintomáticos da infecção (1,7 vezes; $P=0.0061$), quanto portadores de Leucemia Linfoma T do Adulto, estes de forma significativamente estatística (5,6 vezes, $P=0.05$). O paciente com PET/MAH, pela metodologia empregada, apresentou como resultado a ausência na expressão de GATA3, mas, por se tratar de apenas um paciente, a análise estatística não pôde ser realizada. Empregou-se para a análise estatística o teste de Wilcoxon (Teste da soma de ranks de Wilcoxon).

A quantificação dos produtos do PCR, visualizados em gel de agarose a 1,6%, foi feita por densitometria e as médias e os desvios padrões de três experimentos independentes estão representada no gráfico da figura 8.

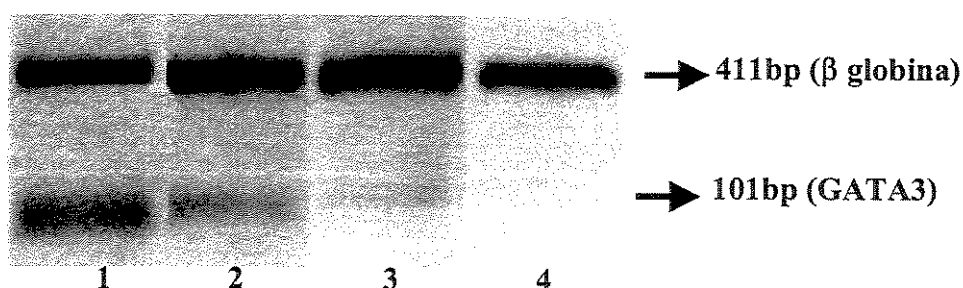


Figura 7: RT-PCR semi-quantitativo. Eletroforese em gel de agarose 1,6 % mostrando os produtos do RT-PCR das amostras de cDNA. Linha 1: doadores saudáveis; linha 2: portadores assintomáticos; linha 3: pacientes portadores de Leucemia Linfoma T do Adulto; linha 4: paciente portador de paraparesia espática tropical/mieolpatia associada ao HTLVII. A análise visual já demonstra evidente diminuição do RNAm em portadores da infecção pelo vírus e em pacientes com as doenças relacionadas à infecção quando comparados a doadores saudáveis.

Resultados

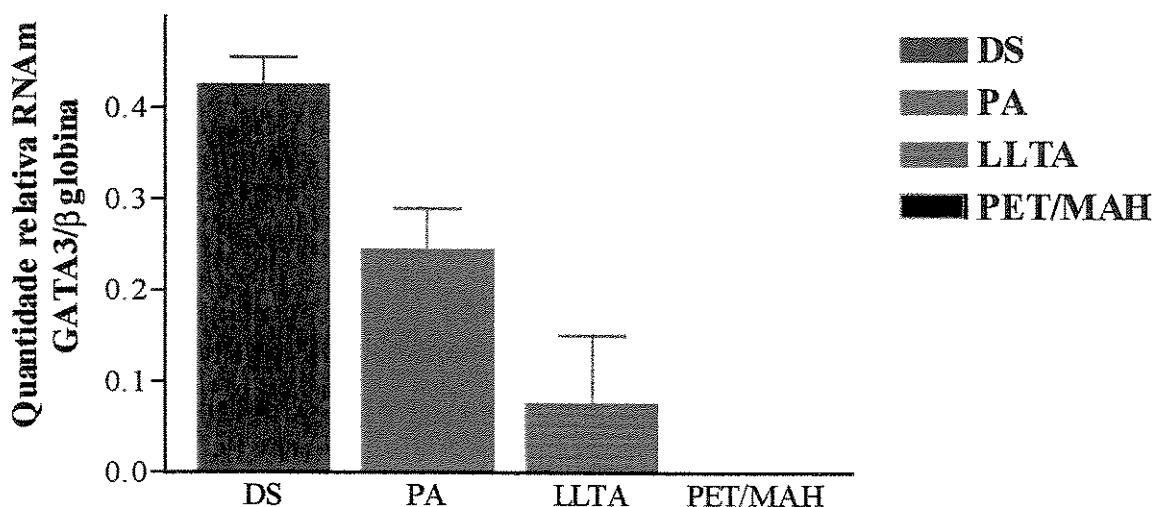


Figura 8: Gráfico representativo do resultado do RT-PCR semi-quantitativo. Expressão relativa do gene GATA3 em doadores de sangue saudáveis (DS), portadores assintomáticos da infecção pelo HTLVI (PA), portadores de Leucemia Linfoma T do Adulto (LLTA) e em um paciente portador de Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLVI (PET/MAH). Quando comparados a indivíduos saudáveis, a diminuição progressiva nos grupos estudados foi de 1,7 e 5,6 vezes, respectivamente para portadores assintomáticos e portadores de LLTA ($P=0.0061$ e $P=0.05$ pelo teste de Wilcoxon). O resultado da análise da expressão do paciente com PET/MAH pela metodologia empregada revelou uma tendência à não expressão.

7. Análise da interação DNA/proteína

A partir da demonstração da redução na expressão do RNAm do fator de transcrição GATA3 em indivíduos portadores do vírus e, mais expressivamente, em pacientes com doenças relacionadas à infecção pelo HTLV I (GILLI et al., 2000), iniciamos a segunda etapa do estudo que objetivou a demonstração da interação entre a proteína transativadora Tax e as regiões de controle transcricional do gene GATA3 no promotor e silenciador do gene. Para tanto, optamos pelo uso da técnica de análise de retardamento em gel.

Resultados

7.1. Obtenção da proteína ZEB

Para confirmação da qualidade da construção p91pGex-Nil-2-a que contém a proteína ZEB enviada pelo pesquisador Dr Thomaz Brabletz (Universidade de Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Alemanha), a mesma foi submetida à dupla digestão com as enzimas BamHI / Xho o que confirmou a especificidade da construção (Figura 9).

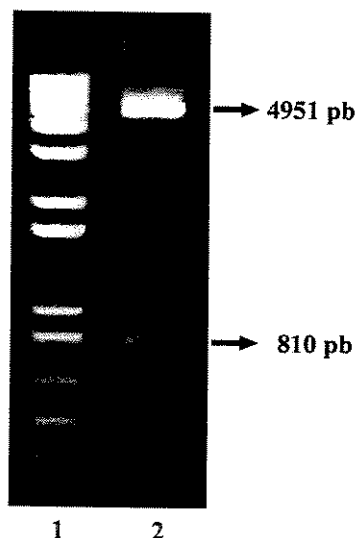


Figura 9: Plasmídeo de expressão da proteína ZEB. Eletroforese em gel de agarose 1%. Linha 1: marcador Ladder 1Kb. Linha 2: representa o produto da dupla digestão com as enzimas BamHI / Xho do plasmídeo p91pGex-Nil-2-a, que expressa a porção C' terminal da proteína ZEB. Os fragmentos de 810 e 4951 pb confirmam a presença e especificidade do plasmídeo em questão.

A proteína ZEB foi extraída utilizando-se a técnica de purificação de GST (Pharmacia, Piscataway, NY), sendo a amostra posteriormente submetida à eletroforese em gel de SDS corado com azul de Comassie. A presença da proteína ZEB no produto da eluição está demonstrada na figura 10.

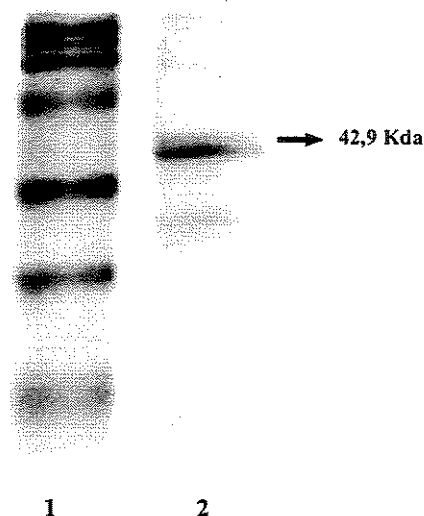


Figura 10: Proteína ZEB. Eletroforese em gel SDS corado com azul de Comassie. Linha 1: Marcador Low Range (BioRad,Richmond,CA). Linha 2: banda de 42,9 KDa que compreende os aminoácidos 839 a 1125 da porção C'terminal da proteína ZEB humana e inclui seu “zinc-finger”.

7.2. Avaliação, através da técnica de análise de retardamento em gel, da interação entre a proteína transativadora viral Tax, o promotor do gene GATA3 e seu silenciador.

Para melhor caracterizar a relação entre a proteína Tax e o fator de transcrição GATA3, avaliamos a provável interação entre Tax e duas regiões distintas do promotor do GATA3 com sítios de ligação para Sp1.

As sondas usadas são referentes ao promotor do gene GATA3 (LABASTIE et al., 1994) com seqüências de oligonucleotídeos baseadas em seqüência previamente descrita (GenBank número X73519) que contém região de consenso para Sp1.

7.2.1. Tax isoladamente não se liga ao promotor do GATA3

Apesar de ser um ativador de promotores celulares, sabe-se que Tax não se liga diretamente ao DNA, mas exerce sua atividade através da interação com fatores de

transcrição celulares. Assim, como esperado, não houve interação direta entre Tax e as regiões do promotor do GATA3 estudadas (figura 11)

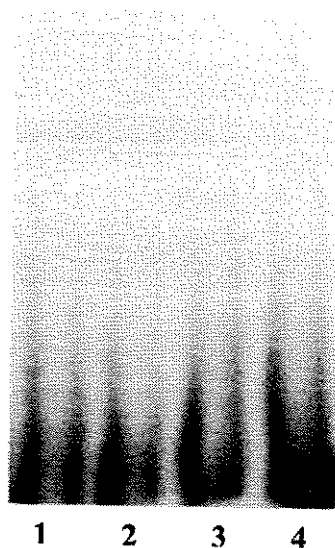


Figura 11: Tax não se liga isoladamente ao DNA. A proteína Tax foi incubada com as sondas referentes às regiões -188 a -174 e -161 a -129, correspondentes às regiões do promotor mínimo do gene GATA3 com sítios de ligação para Sp1. Essas sondas foram marcadas com ^{32}P e a reação ocorreu na presença de poly (dI-dC). Não houve formação de complexo, o que traduz a não ligação dessa proteína com as regiões estudadas.

7.2.2. A interação entre Tax e o promotor do GATA3

Entretanto, quando a proteína Tax e o fator de transcrição Sp1 foram adicionados à mesma reação, um complexo principal denominado C1 foi detectado nas duas regiões avaliadas. Estudos de competição demonstraram que a formação de C1 é específica, já que a adição do competidor não marcado previne a formação do complexo (Figura 12).

A adição do anticorpo anti-Tax, com formação do “supershift”, reforça a presença de Tax neste complexo.

Assim, Tax não se liga diretamente ao promotor na ausência de Sp1, sugerindo que a adição de Sp1 é fundamental para a ligação.

Resultados

Região do promotor
do gene GATA3

-188 a -174

-161 a -129

Sp1	+	+	-	+	-	+	+	+
Tax	+	+	+	+	+	+	+	+
Competição	-	-	-	+	-	-	+	-
Anti-Tax	-	+	-	-	-	-	-	+

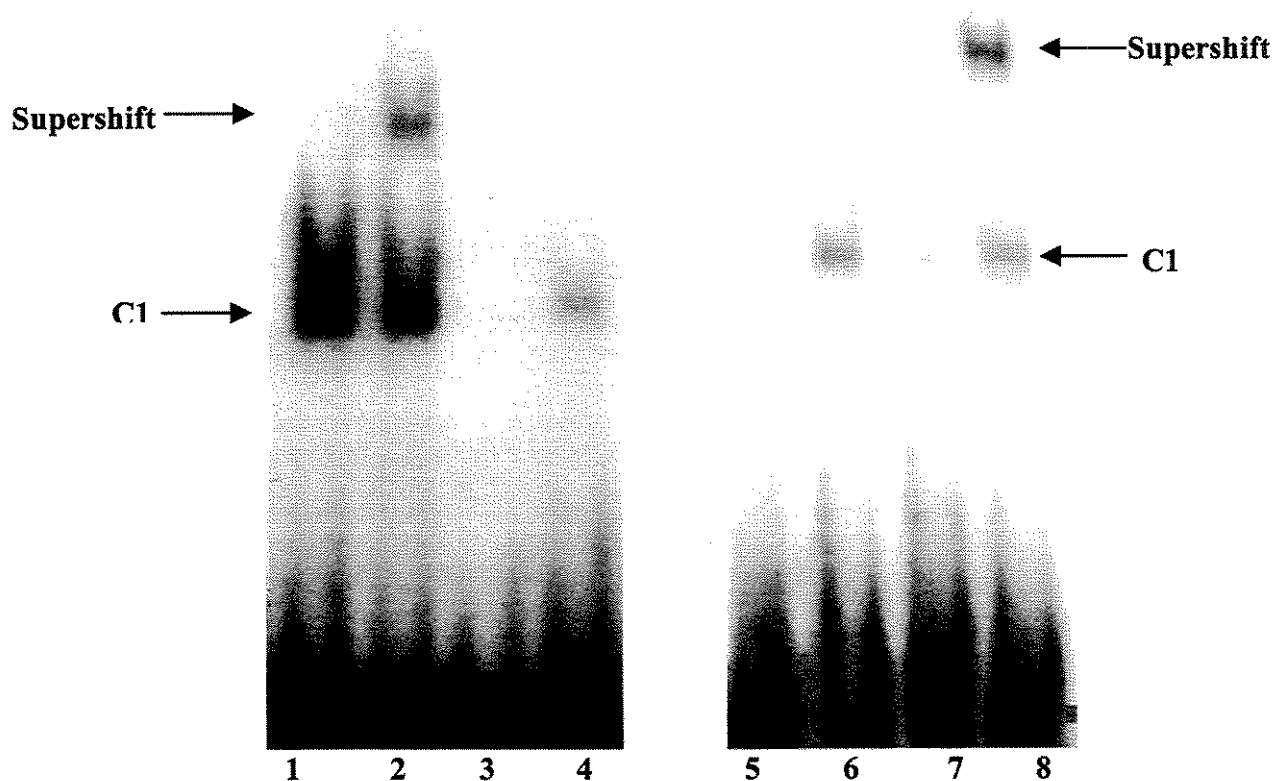


Figura 12: Sp1 promove a interação de Tax no promotor de GATA3. Tax e Sp1 foram submetidos à análise do retardamento em gel usando duas regiões do promotor de GATA3 com a região GGGCGG de ligação para Sp1 como sonda. Como já demonstrado, não houve formação de complexo entre Tax e a sonda marcada, isoladamente (linhas 3 e 5). Entretanto um complexo denominado C1 se formou quando Tax e Sp1 foram adicionados (linhas 1 e 6) e um excesso molar de 100 vezes da sonda competidora não marcada inibiu a formação desse complexo (linhas 4 e 7). Anticorpo anti-Tax foi incubado com Tax 15 minutos após o início da reação, formando uma banda denominada “supershift” que demonstra a especificidade da ligação protéica e reforça a presença da proteína Tax neste complexo (linhas 2 e 8).

Resultados

7.2.3. A interação entre Tax e o silenciador do promotor do GATA3

Do mesmo modo, estudamos a interação entre Tax e a região silenciadora do gene GATA3, localizada entre 8.3 e 5.9 kb 5' do início da transcrição do gene GATA3. O elemento silenciador, que confere especificidade à célula T, está dentro dessa região e inibe a atividade promotora do gene GATA3 em células não T, através de sua interação com ZEB, um potente repressor da transcrição.

A análise de retardamento em gel não demonstrou interação entre a sonda contendo a região CAGGTG E-box e a proteína Tax. Entretanto, quando a proteína ZEB foi adicionada à reação, houve a formação de um complexo único denominado C2. Estudos de competição demonstraram que a formação de C2 é específica, já que a adição do competidor não marcado previne a formação do complexo.

Tanto Tax como ZEB estão presentes na formação desse complexo, como demonstrado pelo “supershift” após a adição dos anticorpos anti-Tax e anti-ZEB em reações separadas (figura 13).

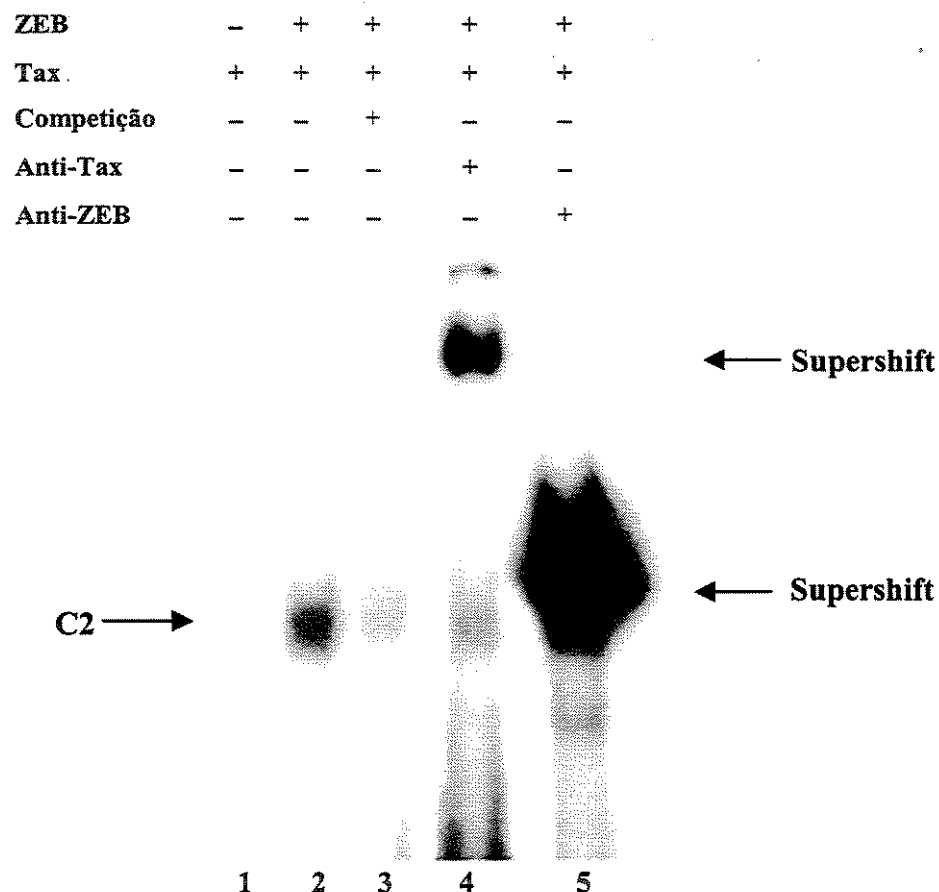


Figura 13: ZEB promove a interação de Tax no silenciador do promotor de GATA3.

Tax e ZEB foram submetidos à análise do retardamento em gel usando a região silenciadora de GATA3 com a sequência CAGGTG de ligação para ZEB como sonda. Não houve formação de complexo entre Tax e a sonda marcada, isoladamente (linha 1). Entretanto, um complexo denominado C2 se formou quando Tax e ZEB foram adicionados (linha 2). Esse complexo foi específico para ZEB, já que um excesso molar de 100 vezes da sonda competidora não marcada inibiu a formação desse complexo (linha 3). A adição dos anticorpos anti-Tax e anti-ZEB induziram a formação do “supershift” confirmando a presença das proteínas Tax e ZEB no complexo C2 (linhas 4 e 5 respectivamente).

Resultados

8. Análise da expressão gênica

A análise da expressão gênica pelo estudo funcional consiste na transfecção celular de moléculas de DNA contendo uma sequência de nucleotídeos sob estudo, acoplada a um gene repórter, que terá sua expressão direcionada por essa sequência de nucleotídeos que, quando introduzida dentro de um sistema biológico, produz uma medida fenotípica.

Uma vez confirmada a interação entre a proteína Tax e as regiões promotora e silenciadora do gene GATA3, iniciamos a terceira etapa do estudo, que consistiu na avaliação funcional *in vitro* do gene GATA3 num modelo celular de linhagem linfóide. Para isso, obtivemos do prof Paul-Henri Romeo (Hopital Henri Mondor, Creteil, France) uma construção contendo a sequência do promotor mínimo do gene GATA3, que compreende a região -96/+598, inserida em um gene reporter cloranfenicol acetil transferase (CAT) do vetor pBLCAT3 (ATCC, Manassas, VA), denominada -96/+598pBLCAT3.

O prof. Chou-Zen Giam (Uniformed Services University of Health Sciences, Bethesda, Maryland) enviou-nos um plasmídeo de expressão da proteína Tax na forma "wild-type" (pWTax) e o mutante V89A (pV89A) com a troca de um aminoácido valina por uma arginina no resíduo 89 da proteína Tax.

O estudo funcional consistiu em co-transfecções em células Jurkat de construções contendo ora a região promotora ora a silenciadora, com as construções de expressão da proteína Tax pWTax e pV89A. Finalmente, para excluir a possibilidade de ativação do vetor vazio pela proteína Tax, avaliamos a expressão do vetor pBLCAT3 vazio e sua resposta na presença dessa proteína.

8.1. Construção do vetor pSIL-GATA3 que contem a região silenciadora do gene GATA3

Para a análise da expressão da região silenciadora do gene quando em contato com a proteína Tax, foi construído um vetor contendo essa região inserido no vetor -96/+598pBLCAT3.

Resultados

8.1.1. Reação de PCR

Para obtenção do fragmento contendo a região silenciadora foi realizada a reação de PCR com os primers pSIL1 e pSIL2 com amplificação de um fragmento de 954 pb. O resultado dessa reação de PCR está demonstrado na figura 14.

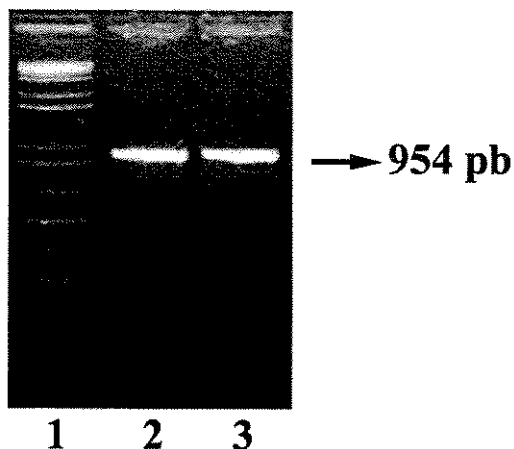


Figura 14: PCR região silenciadora. Eletroforese em gel de agarose 1%. Linha 1- Marcador Ladder 1Kb. Linhas 2 e 3: fragmentos de 954 pb correspondentes ao PCR da região silenciadora do gene GATA3 com os primers pSIL1 e pSIL2.

8.1.2. Ligação ao vetor PCR®2.1

Tanto o produto da ligação do fragmento do PCR da região silenciadora com o vetor PCR®2.1, como o plasmídeo contendo o promotor mínimo foram digeridos com as enzimas Hind III e XbaI. O primeiro foi digerido para isolamento do inserto e o plasmídeo foi digerido para sua linearização. Após a reação de ligação entre o vetor - 96/+598pBLCAT3 linearizado e o fragmento do PCR, a construção resultante foi finalmente submetida à digestão com as enzimas BstEII e BamHI para confirmação da presença do inserto (figura 15). Os produtos obtidos confirmam a presença do inserto clonado na construção.

Resultados

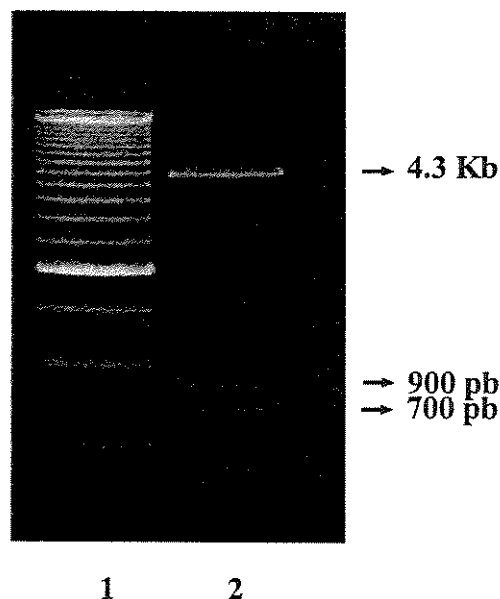


Figura 15: Digestão da construção pSIL-GATA3. Eletroforese em gel de agarose a 1%. Linha 1: Marcador 500 bp DNA Ladder. Linha 2: produtos da dupla digestão com as enzimas HindIII e XbaI da construção obtida da clonagem do fragmento do silenciador do gene GATA3 na construção -96/+598pBLCAT3.

8.1.3. Seqüenciamento da construção pSIL-GATA3

Para verificação da qualidade da construção gênica pSIL-GATA3, foi realizada a reação de seqüenciamento automático. A figura 16 representa o eletroesferograma da construção obtida e demonstra as duas regiões de ligação de ZEB nas regiões -7825 e -7132 do silenciador do gene GATA3 (GenBank número AJ 131811). A inserção do fragmento dentro deste vetor seguiu a orientação 5' → 3' com a seqüência do promotor mínimo a montante (figura 17).

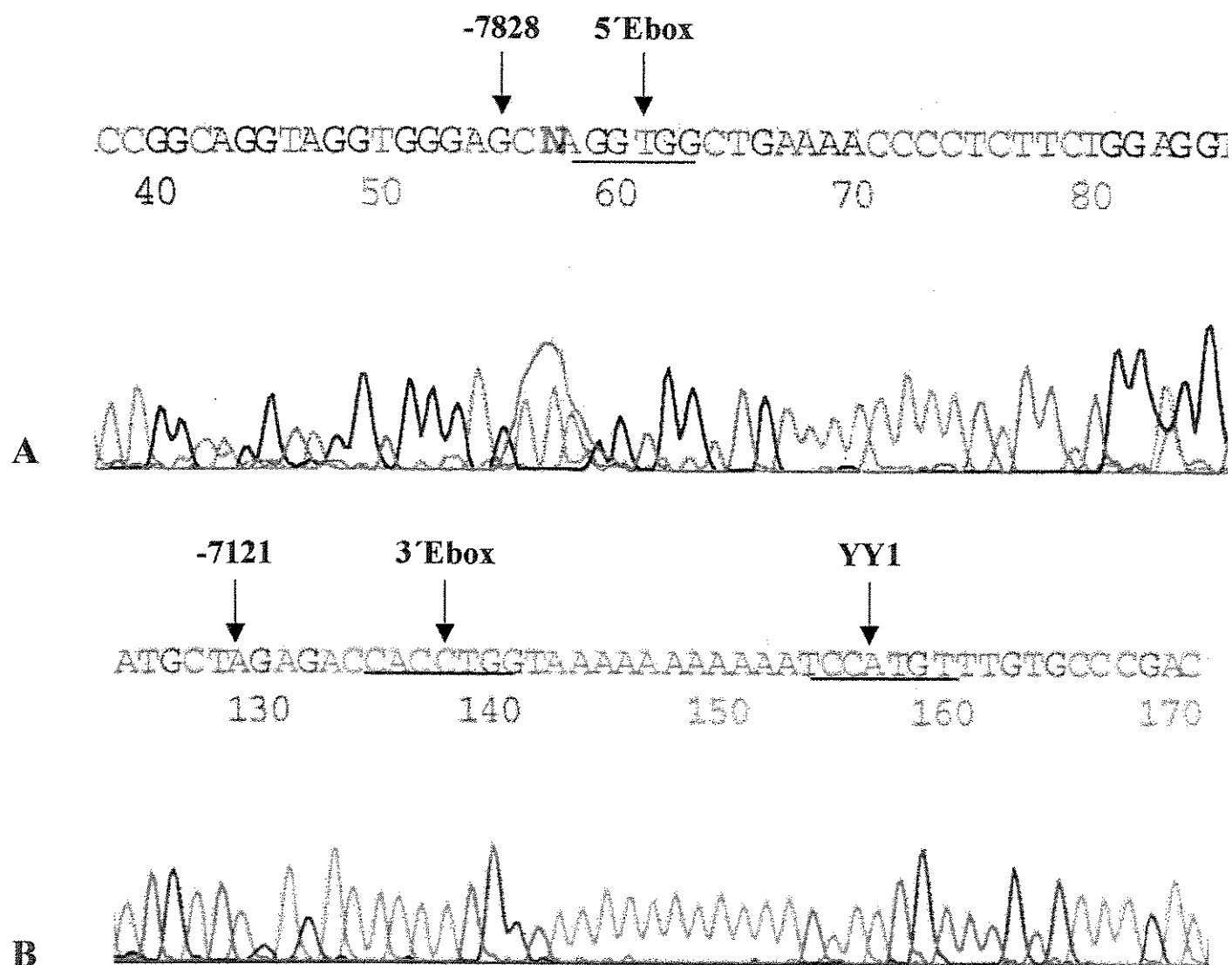


Figura 16: Eletroferograma da construção pSIL-GATA3. Seqüenciamento automático da construção pSIL-GATA3. A: região - 7825 (sendo +1 o início do primeiro intron) com a seqüência de homologia para o silenciador ZEB; em B: região - 7132 que também apresenta a seqüência de homologia para o silenciador ZEB.



Figura 17: Representação esquemática da construção pSIL-GATA3. Esquema da construção contendo o silenciador do gene GATA3 e seu promotor, que direcionam transcricionalmente o gene da cloranfenicol acetil transferase (CAT). O inserto foi introduzido a montante da região promotora mínima com as enzimas Xba e HindIII.

8.2. Confirmação das construções recebidas

Após a maxipreparação, os vetores -96/+598pBLCAT3, pWTax e pV89A foram submetidos à digestão enzimática de acordo com seu mapa de construção, para confirmação da presença do inserto. Todas as digestões confirmaram a presença dos insertos (figura 18).

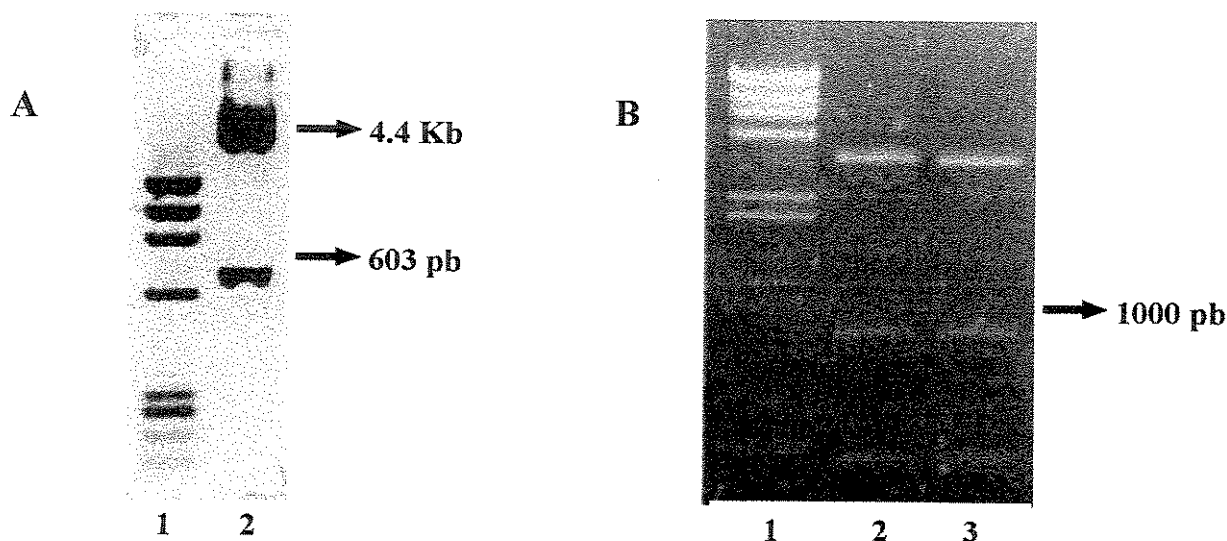


Figura 18: Digestões das construções -96/+598pBLCAT3, pWTax e pV89A. Eletroforese em gel de agarose 1%. A-linha 1- Marcador Φ X174 RF DNA/HaeIII; Linha 2: Fragmento de 603 pb correspondente ao produto da digestão do vetor -96/+598pBLCAT3 com as enzimas BamHI e BstEII; B- Linha 1- marcador λ Hind. Linhas 2 e 3: Fragmento de 1000 pb correspondente ao produto da digestão do vetores pV89A e pWTax com as enzimas Sma I e Nco I.

Resultados

8.3. Transfecção transitória

Uma vez confirmadas as seqüências das construções, foram realizadas as transfecções transitórias por eletroporação em células de linhagem celular Jurkat.

Os extratos celulares foram preparados 48 horas após a transfecção. A absorbância da amostra foi determinada usando-se um leitor de ELISA com comprimento de onda de 405 nm (referência aproximada de 490 nm), que correlaciona diretamente o nível de CAT presente no sobrenadante.

Os valores representados resultam da normalização da leitura do comprimento de onda da quantidade de CAT em relação à leitura do comprimento de onda da quantidade de proteínas totais. Um representa a quantidade de CAT obtida com a transfecção do plasmídeo pBLCAT3 vazio. Todos os experimentos foram realizados 3 vezes de forma independente sempre em triplicata. Os resultados são demonstrados nos gráficos que se seguem (figuras 20 e 21).

8.3.1. Tax induz atividade discreta no promotor mínimo do gene GATA3

Quando comparada à atividade basal do promotor do gene GATA3, a expressão do promotor do gene GATA3 aumentou em 2,0 vezes na presença da proteína Tax (104,17: 80,39-127,94 e 218,08:184,07 – 252,10; $P=0,0014$). O mutante V89A da proteína Tax apresentou aumento em sua expressão de 2,1 vezes: (104,17: 80,39-127,94 e 221,67:161,73-280,57; $P=0.005$) e, portanto, a mesma resposta da forma “selvagem”. O vetor vazio não apresentou variação significativa em sua expressão na presença da proteína Tax. Os valores indicados representam as medianas: com os respectivos intervalos de confiança de 3 experimentos independentes, realizados em triplicata, e estão ilustrados na figura 19.

Apesar do método estatístico de Wilcoxon considerar essas diferenças significativas, o aumento de apenas 2,0 vezes não é considerado relevante quando comparado a experimentos semelhantes publicados na literatura internacional.

Resultados

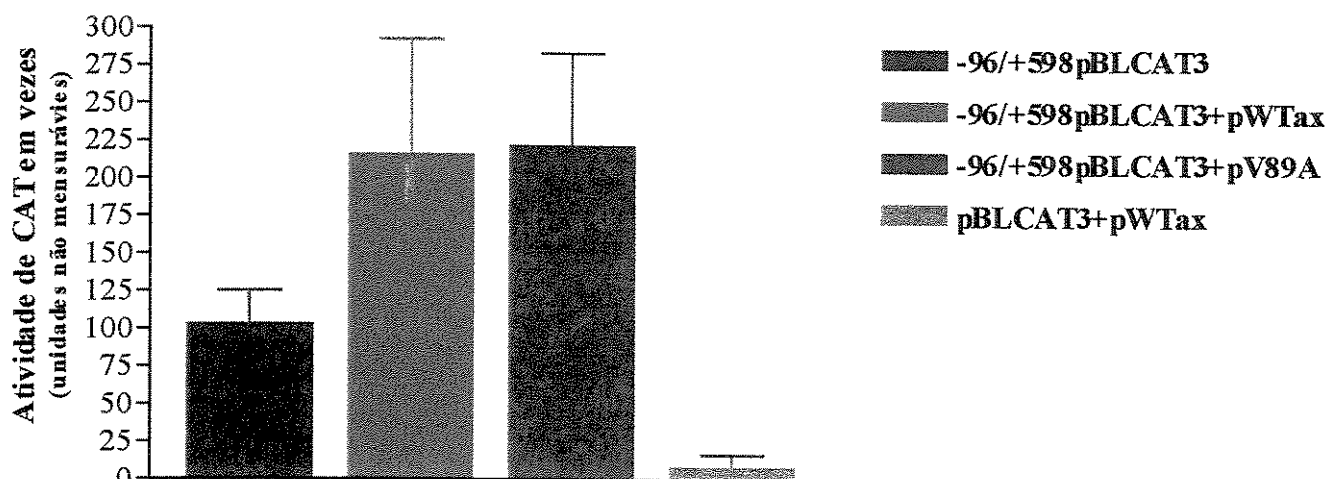


Figura 19: Gráfico representativo da atividade de Tax no promotor do gene GATA3.

Tax induz discreta atividade no promotor mínimo do gene GATA3. A construção -96/+598pBLCAT3, que contém o promotor do gene GATA3 e o gene repórter CAT, transitoriamente co-transfectada em células Jurkat com o vetor de expressão da proteína Tax do HTLVII na sua forma “wild-type”, denominado pWTax, ou com um mutante dessa proteína no resíduo 89, denominado pV89A. Atividade de CAT foi detectada e quantificada utilizando-se a técnica de CAT ELISA e normalizada de acordo com os níveis de proteínas totais. A proteína Tax promove um pequeno aumento na atividade do promotor mínimo do gene GATA3 e essa atividade não é modificada pela proteína mutante de Tax. A atividade de CAT na co-transfecção entre o plasmídeo vazio pBLCAT3 e pWTax foi insignificante. Os valores indicados representam as medianas e seus respectivos intervalos de confiança de 3 transfecções independentes em triplicata e 1 representa a atividade de CAT obtida com o vetor pBLCAT3 vazio.

8.3.2. Tax reprime a atividade do promotor do gene GATA3 na presença do silenciador do gene

Por outro lado, ocorreu redução de 4,9 vezes na atividade de CAT da construção com o silenciador do gene GATA3 na presença da proteína Tax, quando comparada à atividade de CAT sem Tax (38,33: 16,52-60,15 e 189,33: 133,65 – 245,02; $P=0,004$). A proteína Tax

Resultados

mutante restaurou completamente a atividade basal da expressão do silenciador do gene GATA3 em células Jurkat (189,33: 133,65 – 245,02 e 195,83: 134,89-256,77; $P=0,9$). Esse resultado é considerado representativo e denota uma diminuição significativa na expressão do gene GATA3 em interação com a proteína Tax e está representado na figura 20.

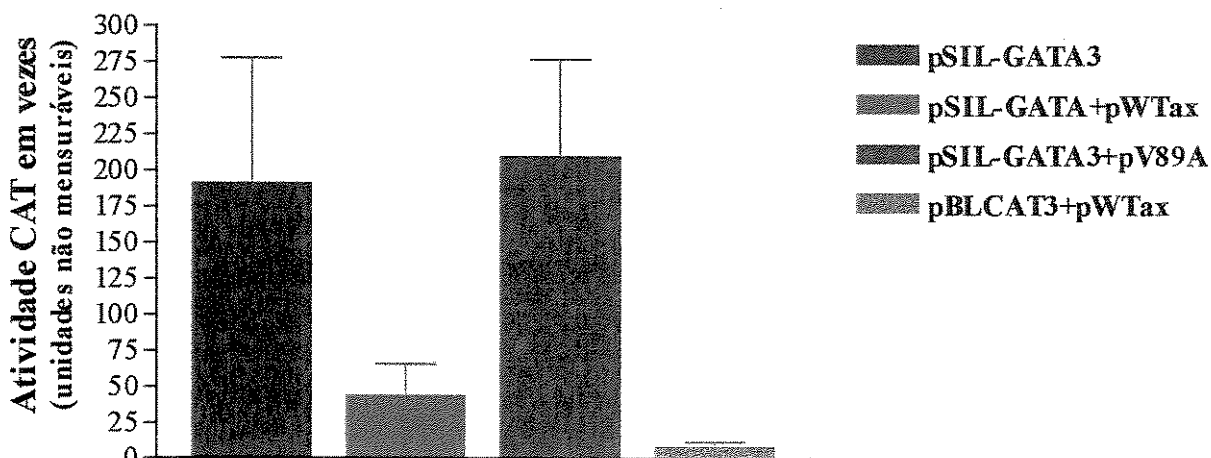


Figura 20: Gráfico representativo da atividade de Tax no silenciador do promotor do gene GATA3. Tax reprime a atividade do promotor do gene GATA3 na presença do seu silenciador. Células Jurkat foram co-transfectadas com o vetor repressor do promotor denominado pSIL-GATA3, e o vetor contendo a sequência codificadora da proteína Tax na forma “wild-type” (pWTax), ou uma forma mutante da proteína na construção pV89A. A atividade de CAT foi detectada usando-se CAT ELISA e normalizada pela quantidade de proteínas totais. O vetor pWTax reduz a expressão de CAT de maneira significativa. Esse efeito não é observado com o mutante pV89A. A atividade de CAT na co-transfecção entre o plasmídeo vazio pBLCAT3 e pWTax foi insignificante. Os valores indicados representam as medianas e os intervalos de confiança de 3 transfecções independentes realizadas em triplicata e 1 representa a atividade de CAT obtida com o vetor pBLCAT3 vazio.

Discussão

O vírus HTLV é classificado como um retrovírus complexo, portador de um genoma diplóide com 9032 nucleotídeos de extensão. Além das proteínas estruturais *gag*, *pol* e *env*, comuns ao genoma de todos os retrovírus, o HTLV codifica várias pequenas proteínas regulatórias, como as proteínas Rex e Tax. O número exato e as ações dessas proteínas ainda não foram definidos, mas alguns pontos são claros: Tax ativa a transcrição do pró-vírus do HTLV e Rex regula o transporte intracelular do RNAm viral. Tax também ativa a transcrição de vários outros genes do hospedeiro, como os genes de IL-2, IL-2R, IL-3, IL-4, fator estimulador de colônia de macrófagos, PCNA, TGF- β , vimectina, proencefalina, *egr-1*, *egr-2*, *fra-1*, *c-fos*, *c-myc*, *c-sis*, *bcl-x1*, *c-Jun*, *jun-B*, *Jun-D*, CREB, NF- κ B e SRF (YOSHIDA, 2001); alguns, como CD25, através de um efeito direto no promotor do gene hospedeiro, e outros, como IL2, como consequência secundária da potente ativação da célula T induzida por Tax.

Vários autores têm demonstrado que Tax é a principal proteína envolvida na transformação celular determinada pelo HTLV, e as bases moleculares dessa transformação ainda são objeto de investigação (GRASSMANN et al., 1992; GRASSMANN e FLECKENSTEIN, 1989). Retrovíruses envolvidas em transformações celulares tipicamente codificam oncogenes mediadores da transformação viral, ou promovem a desintegração da expressão de genes celulares como resultado da sua integração ao genoma do hospedeiro (BRUGGE e ERIKSON, 1977; PAUL et al., 1989). Nenhum desses modelos clássicos, entretanto, explica a transformação pelo HTLV-I, uma vez que a interação pró-viral é aleatória e que nenhum homólogo celular de Tax foi identificado até então. Embora nenhum sítio de interação comum seja demonstrado entre pacientes, a interação do genoma viral com o DNA celular do hospedeiro é monoclonal em células transformadas de um determinado indivíduo, sugerindo que a interação ocorra antes da transformação e que a transformação seja um evento raro entre células infectadas (GATZA et al., 2003). Numerosos estudos têm demonstrado que a expressão de Tax é tanto necessária como suficiente para o estabelecimento e a manutenção do fenótipo transformado.

A infecção pelo HTLV I está associada à fisiopatologia de duas síndromes distintas: uma de natureza proliferativa -a leucemia/linfoma T do adulto (LLTA), e outra de natureza

Discussão

inflamatória, que tem como principal exemplo a paraparesia espástica tropical/ mielopatia associada ao HTLV I (PET/MAH). Apesar de a infecção pelo HTLV-I apresentar um longo curso latente *in vivo*, na realidade observamos a existência de uma batalha contínua entre um vírus extremamente bem adaptado e o sistema imune mediado por células do hospedeiro, onde o resultado final é decidido pela eficiência da resposta deste último.

O fator de transcrição GATA3 está intimamente relacionado à eficiência dessa resposta. Trata-se de um fator de transcrição que foi originalmente identificado como uma proteína que se ligava ao facilitador (“enhancer”) do gene do receptor α de células T (RCT α). Apesar de ser demonstrada sua expressão em tecidos em desenvolvimento como placenta, sistema nervoso central e periférico, fígado e timo embrionários, rins e adrenais, sua área de atuação está dentro do sistema hematopoético, mais precisamente em linfócitos. Dentro dessa linhagem celular sua expressão está confinada a células T e células “natural killer” (GEORGE et al., 1994; HENDRIKS et al., 1999; HO et al., 1991). O fator de transcrição GATA3 participa do desenvolvimento das células T, que ocorre a partir de células progenitoras pluripotenciais que dão origem a duas linhagens: a mielóide, que dá origem também à linhagem eritróide, e a linhagem linfóide, composta por linfócitos T e B. Sob influências externas, essas células proliferam-se e diferenciam-se de modo progressivo até atingirem a maturidade.

A hipótese inicial por nós formulada, idealizada a partir do estudo de Pandolfi (PANDOLFI et al., 1995), que demonstrava que o comprometimento na expressão do gene GATA3 gerava anormalidades no sistema nervoso central, periférico e hematopoético, aventava a existência de regulação da expressão do gene GATA3 pelo vírus HTLVI. Com o objetivo de se comprovar tal hipótese, quantificou-se o RNAm do gene GATA3 através da realização de PCR-semiquantitativo em indivíduos saudáveis, em portadores assintomáticos da infecção e em indivíduos com as duas principais doenças associadas à infecção pelo HTLVI: a Leucemia Linfoma T do Adulto e a Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLVI.

Através dessa técnica, que apresenta grande especificidade e fácil reprodutibilidade dos resultados, demonstramos uma significativa redução da expressão do gene GATA3 em portadores assintomáticos e em pacientes com as doenças relacionadas à infecção pelo

Discussão

HTLVII, quando comparada à expressão em indivíduos saudáveis (redução de 1,7 vezes e 5,6 vezes em pacientes portadores assintomáticos e com Leucemia Linfoma T do Adulto, respectivamente). A expressão do gene GATA3 no único paciente portador de Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLVII estudado mostrou-se extremamente reduzida (tendendo a zero), embora não tenha sido possível a avaliação da significância estatística desse resultado devido ao tamanho reduzido da amostra.

Uma vez identificada a diminuição progressiva da expressão do gene GATA3 entre portadores assintomáticos do vírus e pacientes com as doenças relacionadas à infecção pelo HTLVII, cumpria-se elucidar quais seriam as regiões de controle transcricional envolvidas na regulação da expressão do gene, qual o fator viral que influenciaria tal regulação e qual o resultado da interação deste fator viral em cada região estudada. Com esse objetivo, optou-se pela avaliação funcional através da utilização de um gene repórter em um modelo celular *in vitro*. Foram, então, realizados experimentos de interação DNA-proteína, através da técnica de retardamento em gel, e de expressão gênica, utilizando-se genes repórteres direcionados pela expressão do gene GATA3.

O ensaio de “gel-shift” demonstrou a interação entre Tax e Sp1 com o promotor do gene GATA3, e entre Tax e ZEB com o seu silenciador. Essas interações foram confirmadas pelos ensaios de competição e “supershift”, este último demonstrando a ligação dos anticorpos anti-Tax e anti-ZEB, confirmando, dessa forma, a presença dessas proteínas nessa interação.

A resposta sobre a consequência da interação entre essa proteína viral (Tax) e o DNA celular do hospedeiro, *in vitro* ou *in vivo*, surgiu dos experimentos de transfecção de modelos vivos, onde foram utilizadas construções com o gene em estudo, que direcionavam a transcrição de um gene repórter.

O estudo de Romeo (GREGOIRE e ROMEO, 1999), que definiu o controle transcricional do gene GATA3, empregava uma construção utilizando-se o promotor mínimo ligado ao gene repórter da cloranfenicol acetil transferase (CAT). Utilizamos esta mesma construção, que nos foi fornecida por esse autor, e a construção com o silenciador foi feita inserindo-se a região silenciadora a montante da sequência do promotor mínimo.

Discussão

A proteína Tax poderia ser introduzida no experimento através de sua internalização, como demonstrado por Marriott, et al (MARRIOTT et al., 1992), ou através da co-transfecção com um vetor de expressão. Escolhemos a segunda opção.

Apesar de ter sido demonstrado um aumento de duas vezes na expressão do promotor mínimo do gene GATA3 na presença da proteína Tax, este resultado não é considerado relevante quando comparado a resultados de experimentos semelhantes verificados na literatura.

O resultado mais expressivo e mais significativo foi obtido a partir da transfecção da construção contendo a região silenciadora ligada ao promotor mínimo. O resultado demonstra que a atividade do gene repórter sofreu redução significativa na presença do vetor de expressão da proteína Tax, quando comparada à atividade basal da mesma construção.

Nenhum estudo anterior havia demonstrado a atividade do gene GATA3 na presença do transativador viral Tax. O único estudo que correlacionou esses dois elementos foi o realizado por Blumenthal et al (BLUMENTHAL et al., 1999), onde demonstrou-se um aumento do sinergismo via Tax (ou outro estimulador como ionomicina) na ligação de Est1 e Est2 (fatores de transcrição ativadores de genes celulares) com o fator de transcrição GATA3, com conseqüente estímulo do promotor da interleucina-5, além de uma inibição do mesmo promotor na presença do fator de transcrição Elf-1.

Os resultados obtidos fecharam um ciclo: durante o curso da infecção pelo HTLVII existe uma diminuição progressiva da expressão do gene GATA3, partindo-se de um portador assintomático até as doenças associadas à infecção, devendo-se essa diminuição à interação entre o ativador transcricional do vírus, que está implicado numa série de outras interações com genes celulares, e o silenciador do gene, via fator de transcrição ZEB.

Vejamos as implicações desses resultados.

Inicialmente, podemos considerar que a inibição funcional do gene GATA3 possa ser um mecanismo através do qual o vírus enfraqueça o sistema imune ou o desequilíbrio, o que poderia ser um dos fatores importantes tanto no desenvolvimento da proliferação celular como na doença inflamatória causada pelo vírus. As evidências abaixo poderiam explicar essa hipótese.

Discussão

Está demonstrado que GATA3 exerce um papel marcante na regulação e diferenciação de células Th2 (FARRAR et al., 2001). Como já comentado, a expressão de GATA3 ocorre por atividade em facilitadores (“enhancers”) dos genes dos receptores de células T, TCR- α , β , e δ (LEIDEN, 1993), e em promotores/enhancers de CD8 α (LANDRY et al., 1993), e essa expressão aumenta substancialmente durante a diferenciação de Th2 (ZHANG et al., 1997; ZHENG e FLAVELL, 1997).

Células CD4+ são fundamentais para a indução e manutenção das respostas humoral e celular aos patógenos. Uma interferência na diferenciação ou na produção de células Th2 poderia contribuir para um estado de imuno-deficiência que, em conjunto com outras alterações moleculares e bioquímicas, favoreceria a proliferação de células infectadas pelo vírus e o conseqüente desenvolvimento das doenças relacionadas à infecção.

Na paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLVI, por exemplo, a resposta imune é classicamente descrita como elemento fundamental para o desenvolvimento da doença. Apesar deste desenvolvimento não ser bem compreendido, as respostas imunológicas determinadas pela interação vírus-hospedeiro têm papel central na fisiopatologia da doença, sendo que a proteína Tax é o principal alvo de reconhecimento de linfócitos T citotóxicos (LTC) nas respostas individuais (BIEGANOWSKA et al., 1999; JACOBSON et al., 1990; KANNAGI et al., 1992; PARKER et al., 1992; PARKER et al., 1994).

Entretanto, considerando-se que: as células CD4+ são o principal alvo da infecção viral *in vivo* (HANON et al., 2000; RICHARDSON et al., 1990), que são células secretoras de mediadores pró-inflamatórios e citocinas neurotóxicas (HANON et al., 2001; NISHIURA et al., 1996), que altos níveis dessas citocinas foram encontrados no líquido cérebro espinhal e nas lesões do cordão espinhal de pacientes com PET/MAH (KURODA e MATSUI, 1993; NAKAMURA et al., 1993; UMEHARA et al., 1994), e que a infecção pelo HTLVI de células CD4+ pode comprometer a função da célula T helper (POPOVIC et al., 1984; YARCHOAN et al., 1986), a resposta CD4+ também deve ser reverenciada.

Goon et al encontraram uma frequência média de células CD4+, específicas para as porções Env e Tax, 25 vezes maior em pacientes com PET/MAH quando comparada à de portadores assintomáticos (GOON et al., 2002). Dentro do contingente proliferado de

Discussão

células CD4+, o fenótipo Th1 é relativamente dominante, mas certamente ocorre uma colaboração entre todas as vias do sistema imune na conclusão da resposta efetora. Um desequilíbrio quantitativo ou qualitativo em algum ponto dessas vias, como, por exemplo, aquele determinado pela diminuição na diferenciação de células Th2 como consequência da regulação negativa do gene GATA3 induzido por Tax, poderia causar um desarranjo funcional na resposta imune responsável pela fisiopatologia dessa doença.

Por outro lado, a supressão da imunidade celular em portadores assintomáticos da infecção pelo HTLVI e em portadores de Leucemia-Linfoma T do Adulto sempre foi muito bem documentada (KATSUKI et al., 1987; TACHIBANA et al., 1988; WELLES et al., 1994), mas a resposta das células T CD4+ na infecção pelo HTLVI nunca foi estudada de forma aprofundada, sendo a resposta citotóxica o foco principal da maioria dos investigadores.

Sabe-se que as células T CD4+ são necessárias para respostas adequadas de células CD8+ e resposta humoral (POPOVIC et al., 1984; YARCHOAN et al., 1986). A infecção pelo HTLVI em células T CD4+ apresenta duas implicações importantes: o rompimento da função celular normal, através da regulação positiva na expressão de genes celulares por Tax, e a expressão de proteínas virais em células CD4+, que a tornariam suscetíveis à ação autóloga de células T citotóxicas.

Existem alguns trabalhos que demonstram o comprometimento de células Th2 em portadores de LLTA secundária à infecção pelo HTLVI, como os estudos de Sagawa et al e Yamada et al (SAGAWA et al., 1996; YAMADA et al., 1996) que descreveram casos de LLTA CCR4 negativo, onde CCR4 é um marcador de citocina específico de célula Th2. Se o desenvolvimento de LLTA está relacionado à regulação negativa de CCR4 ou se o desenvolvimento de LLTA ocorre a partir do fenótipo CCR4 negativo, não se sabe.

Outro aspecto importante a ser considerado é que, apesar de existirem dados controversos na literatura, de forma geral, pacientes com LLTA não mais expressam proteínas virais. Se a expressão contínua de Tax é necessária para a manutenção do fenótipo leucêmico, tal questão ainda permanece controversa (GATZA et al., 2003) e, talvez, células imortalizadas não necessitariam da expressão de Tax, uma vez que poderiam ser selecionadas durante o desenvolvimento de LLTA. Tax promove a proliferação de

Discussão

células infectadas pelo HTLVI exercendo, inicialmente, influência na expressão de genes do hospedeiro, alterando principalmente o ciclo celular e as vias normais de reparo do DNA, com acúmulo gradual de mutações e, no decorrer do curso da infecção, determinando o desenvolvimento de aberrações cromossômicas e instabilidade gênica que culminariam com a manifestação do fenótipo leucêmico. Sendo assim, toda a base necessária para a transformação celular parece decorrer do efeito exercido por Tax.

Publicações recentes relatam expressão alterada de GATA3 em algumas neoplasias, como o carcinoma de esôfago (LIN et al., 2000; SHIGA et al., 1993), câncer de mama (HOCH et al., 1999) e carcinoma gástrico (BAI et al., 2000). A regulação negativa de GATA3 foi correlacionada com a imortalização *in vitro* mediada pelo vírus HPV e carcinogênese cervical (STEENBERGEN et al., 2002). Outro estudo que utilizou o mutante KRR, forma dominante negativa do gene GATA3, mostrou que GATA3 parece ter um papel importante na manutenção do balanço homeostático entre a expansão proliferativa e a eliminação de linfócitos T ativados, mantendo-se dessa forma um compartimento periférico de células T com tamanho constante ao longo do tempo (YAMAGATA et al., 2000). Portanto, apesar de alguns autores demonstrarem a ausência da proteína Tax no fenótipo leucêmico de pacientes com LLTA, as alterações moleculares por ela causadas seriam suficientes para o desenvolvimento e sustentação desse fenótipo, e a regulação negativa de GATA3 poderia estar colaborando com o desenvolvimento desse fenótipo, através da quebra neste balanço, com predomínio na expansão proliferativa de linfócitos T.

A finalidade desse trabalho não foi realizar um estudo clínico sobre a influência do gene GATA3 na LLTA, mas mostrar a observação de sua regulação na infecção pelo HTLVI. Esse é um campo que merece ser explorado.

Em nosso trabalho demonstramos também que o mutante da proteína Tax parece abolir o efeito inibitório de Tax no silenciador do gene GATA3. Tax liga-se a CBP/p300 e determina a acessibilidade do complexo CBP/p300 a elementos específicos do DNA (SUZUKI et al., 1999b), resultando em transativação mediada por Tax de genes virais (GIEBLER et al., 1997) e fatores de crescimento (SIEKEVITZ et al., 1987), ou, ainda, em transrepressão de p18 (SUZUKI et al., 1999a), DNA polimerase β e gene *bax*

Discussão

(BRAUWEILER et al., 1997) mediadas pela mesma proteína. CBP e p300 interagem com a proteína Tax formando um complexo estável que contém CBP, p300, Tax e CRB na região de ativação do LTR viral. A proteína Tax mutante usada em nosso estudo, derivada da expressão do vetor CMVpV89A, é incapaz de se ligar a CBP/p300 e, portanto, incapaz de ativar a transcrição.

Por outro lado, a repressão de ZEB é exercida por várias regiões repressoras dentro da região central da proteína, localizadas na sua porção N' e C' terminais. Os estudos que correlacionam ZEB a p300 e/ou CBP foram feitos por Postigo et al. Esses autores descreveram que a proteína ZEB, ao se ligar à proteína Smad via p300, pode antagonicamente ativar sua transcrição (POSTIGO, 2003). Em outro estudo, demonstraram que a proteína ZEB regula a sinalização de TGF β /BMP (família de fatores de crescimento que regulam a diferenciação e o crescimento celulares) através do recrutamento diferencial de co-ativadores p300 e P/CAF e co-repressores (CtBP) (POSTIGO et al., 2003). p300 é um coativador transcricional integrante de vários processos intracelulares (JANKNECHT e HUNTER, 1996). Interage com vários fatores de transcrição celulares atuando em vias de sinalização.

Assim, uma hipótese formulada é que a ligação de Tax a ZEB poderia ocorrer via p300 e que esse complexo protéico atuaria em algumas vias de sinalização celulares, ora ativando-as ora reprimindo-as, como no caso do gene GATA3. Entretanto, em nosso estudo não foi avaliada a presença de p300 no complexo protéico de interação no silenciador do gene GATA3. Outros estudos necessitam ser realizados para a avaliação da presença desse importante fator de transcrição celular e o significado funcional dessa interação em outras vias de sinalização celular.

Finalmente, esse estudo abre as portas para novos estudos. A presença de GATA3 em células do sistema nervoso central foi demonstrada (LABASTIE et al., 1994). Por se tratar de uma maquinaria celular completamente diferente da linfóide, a expressão desse fator de transcrição, sua regulação pela proteína Tax e as consequências dessa regulação no sistema nervoso central necessitam de elucidação.

Em analogia ao presente estudo, a relação entre o gene GATA3 e a infecção causada por outro retrovírus, o HIV-1, também poderia ser estudada. Existem trabalhos (JONES et

Discussão

al., 1986) que demonstram a existência de interação entre Sp1 e a região de controle transcricional do HIV-1, e essa interação, em conjunto com outros elementos transcripcionais localizados abaixo do RNA “cap site”, poderia mediar a resposta do LTR viral à transativação do vírus. Essa interação poderia influenciar a transcrição do gene GATA3?

Conclusão

Podemos concluir com esse estudo que de acordo com o primeiro objetivo:

- ✓ Existe diminuição na expressão do RNAm do gene GATA3 em portadores da infecção pelo HTLVI e essa diminuição se torna mais significativa nas doenças relacionadas à infecção viral: Leucemia Linfoma T do adulto e Paraparesia espástica tropical/Mielopatia Associada ao HTLVI.

De acordo com o segundo objetivo:

- ✓ Existe interação entre o transativador viral Tax e as regiões de controle transcricional da célula T, ou seja, o promotor e o silenciador do gene.
- ✓ A interação nas regiões de controle transcricional do gene GATA3 ocorre, no promotor, através do fator de transcrição Sp1 e, no silenciador, através do repressor ZEB.

De acordo com o terceiro objetivo:

- ✓ Nos estudos funcionais observamos aumento discreto na atividade promotora do gene GATA3 quando na presença de Tax e do fator de transcrição Sp1.
- ✓ Por outro lado, ocorre repressão marcante do promotor na presença de Tax e do repressor ZEB.

Além disso:

- ✓ A baixa expressão de GATA3 na infecção pelo HTLVI pode estar envolvida na fisiopatologia das doenças relacionadas à infecção viral, ou esta pode decorrer de uma desregulação do sistema imune do hospedeiro.
- ✓ O estudo da expressão desse fator de transcrição poderia ser usado como um dos fatores prognósticos da doença, uma vez que ficou bem estabelecida uma relação inversamente proporcional entre essa expressão e a progressão da infecção pelo HTLVI.

Conclusão

Referências Bibliográficas

ADYA, N.;GIAM, C. Z. Distinct regions in human T-cell lymphotropic virus type I tax mediate interactions with activator protein CREB and basal transcription factors. **J Virol**, 69: 1834-41, 1995.

ALEXANDROPOULOS, K.;CHENG, G.;BALTIMORE, D. Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92: 3110-4, 1995.

ARAUJO ADE, Q.;DE ANDRADA-SERPA, M. J. Tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy in Brazil. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, 13 Suppl 1: S33-7, 1996.

ARCECI, R. J.;KING, A. A.;SIMON, M. C.;ORKIN, S. H.;WILSON, D. B. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. **Mol Cell Biol**, 13: 2235-46, 1993.

ARISAWA, K.;SODA, M.;ENDO, S.;KUROKAWA, K.;KATAMINE, S.;SHIMOKAWA, I., et al. Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan. **Int J Cancer**, 85: 319-24, 2000.

ARIUMI, Y.;KAIDA, A.;LIN, J. Y.;HIROTA, M.;MASUI, O.;YAMAOKA, S., et al. HTLV-1 tax oncoprotein represses the p53-mediated trans-activation function through coactivator CBP sequestration. **Oncogene**, 19: 1491-9, 2000.

BAL, Y.;AKIYAMA, Y.;NAGASAKI, H.;YAGI, O. K.;KIKUCHI, Y.;SAITO, N., et al. Distinct expression of CDX2 and GATA4/5, development-related genes, in human gastric cancer cell lines. **Mol Carcinog**, 28: 184-8, 2000.

Referências Bibliográficas

BALLARD, D. W.;BOHNLEIN, E.;LOWENTHAL, J. W.;WANO, Y.;FRANZA, B. R.;GREENE, W. C. HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene. **Science**, 241: 1652-5, 1988.

BIEGANOWSKA, K.;HOLLSBERG, P.;BUCKLE, G. J.;LIM, D. G.;GRETEN, T. F.;SCHNECK, J., et al. Direct analysis of viral-specific CD8+ T cells with soluble HLA-A2/Tax11-19 tetramer complexes in patients with human T cell lymphotropic virus-associated myelopathy. **J Immunol**, 162: 1765-71, 1999.

BLATTNER, W. A.;BIGGAR, R. J.;WEISS, S. H.;CLARK, J. W.;GOEDERT, J. J. Epidemiology of human lymphotropic retroviruses: an overview. **Cancer Res**, 45: 4598s-601s, 1985.

BLAYNEY, D. W.;BLATTNER, W. A.;ROBERT-GUROFF, M.;JAFFE, E. S.;FISHER, R. I.;BUNN, P. A., JR., et al. The human T-cell leukemia-lymphoma virus in the southeastern United States. **Jama**, 250: 1048-52, 1983.

BLUMENTHAL, S. G.;AICHELE, G.;WIRTH, T.;CZERNILOFSKY, A. P.;NORDHEIM, A.;DITTMER, J. Regulation of the human interleukin-5 promoter by Ets transcription factors. Ets1 and Ets2, but not Elf-1, cooperate with GATA3 and HTLV-I Tax1. **J Biol Chem**, 274: 12910-6, 1999.

BOSSELUT, R.;DUVALL, J. F.;GEGONNE, A.;BAILLY, M.;HEMAR, A.;BRADY, J., et al. The product of the c-ets-1 proto-oncogene and the related Ets2 protein act as transcriptional activators of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus HTLV-1. **Embo J**, 9: 3137-44, 1990.

BOSSELUT, R.;LIM, F.;ROMOND, P. C.;FRAMPTON, J.;BRADY, J.;GHYSDAEL, J. Myb protein binds to multiple sites in the human T cell lymphotropic virus type 1 long terminal repeat and transactivates LTR-mediated expression. **Virology**, 186: 764-9, 1992.

Referências Bibliográficas

BOURGEOIS, A.;HENZEL, D.;MALONGA-MOUELET, G.;DIBANGA, G.;TSOBOU, C.;PEETERS, M., et al. Clinical algorithms for the screening of pregnant women for STDs in Libreville, Gabon: which alternatives? **Sex Transm Infect**, 74: 35-9, 1998.

BRAUWEILER, A.;GARRUS, J. E.;REED, J. C.;NYBORG, J. K. Repression of bax gene expression by the HTLV-1 Tax protein: implications for suppression of apoptosis in virally infected cells. **Virology**, 231: 135-40, 1997.

BRIGGS, M. R.;KADONAGA, J. T.;BELL, S. P.;TJIAN, R. Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor, Sp1. **Science**, 234: 47-52, 1986.

BRUGGE, J. S.;ERIKSON, R. L. Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. **Nature**, 269: 346-8, 1977.

CHOMCZYNSKI, P.;SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, 162: 156-9, 1987.

CHRIVIA, J. C.;KWOK, R. P.;LAMB, N.;HAGIWARA, M.;MONTMINY, M. R.;GOODMAN, R. H. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. **Nature**, 365: 855-9, 1993.

DORFMAN, D. M.;WILSON, D. B.;BRUNS, G. A.;ORKIN, S. H. Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. **J Biol Chem**, 267: 1279-85, 1992.

DYNAN, W. S.;SAZER, S.;TJIAN, R.;SCHIMKE, R. T. Transcription factor Sp1 recognizes a DNA sequence in the mouse dihydrofolate reductase promoter. **Nature**, 319: 246-8, 1986.

Referências Bibliográficas

ELOVAARA, I.;KOENIG, S.;BREWAH, A. Y.;WOODS, R. M.;LEHKY, T.;JACOBSON, S. High human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific precursor cytotoxic T lymphocyte frequencies in patients with HTLV-1-associated neurological disease. **J Exp Med**, 177: 1567-73, 1993.

FARRAR, J. D.;OUYANG, W.;LOHNING, M.;ASSENMACHER, M.;RADBRUCH, A.;KANAGAWA, O., et al. An instructive component in T helper cell type 2 (Th2) development mediated by GATA-3. **J Exp Med**, 193: 643-50, 2001.

FERBER, I. A.;LEE, H. J.;ZONIN, F.;HEATH, V.;MUI, A.;ARAI, N., et al. GATA-3 significantly downregulates IFN-gamma production from developing Th1 cells in addition to inducing IL-4 and IL-5 levels. **Clin Immunol**, 91: 134-44, 1999.

FERREIRA, O. C., JR.;PLANELLES, V.;ROSENBLATT, J. D. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. **Blood Rev**, 11: 91-104, 1997.

FRANCHINI, G.;MULLOY, J. C.;KORALNIK, I. J.;LO MONICO, A.;SPARKOWSKI, J. J.;ANDRESSON, T., et al. The human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I p12I protein cooperates with the E5 oncoprotein of bovine papillomavirus in cell transformation and binds the 16-kilodalton subunit of the vacuolar H⁺ ATPase. **J Virol**, 67: 7701-4, 1993.

FURUKAWA, K.;SHIKU, H. Alternatively spliced mRNA of the pX region of human T lymphotropic virus type I proviral genome. **FEBS Lett**, 295: 141-5, 1991.

GALLO, R. C.;BLATTNER, W. A.;REITZ, M. S., JR.;ITO, Y. HTLV: the virus of adult T-cell leukaemia in Japan and elsewhere. **Lancet**, 1: 683, 1982.

GATZA, M. L.;WATT, J. C.;MARRIOTT, S. J. Cellular transformation by the HTLV-I Tax protein, a jack-of-all-trades. **Oncogene**, 22: 5141-9, 2003.

Referências Bibliográficas

GEORGE, K. M.;LEONARD, M. W.;ROTH, M. E.;LIEUW, K. H.;KIOUSSIS, D.;GROSVELD, F., et al. Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. **Development**, 120: 2673-86, 1994.

GESSAIN, A.;BOERI, E.;YANAGIHARA, R.;GALLO, R. C.;FRANCHINI, G. Complete nucleotide sequence of a highly divergent human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type I (HTLV-I) variant from melanesia: genetic and phylogenetic relationship to HTLV-I strains from other geographical regions. **J Virol**, 67: 1015-23, 1993.

GIEBLER, H. A.;LORING, J. E.;VAN ORDEN, K.;COLGIN, M. A.;GARRUS, J. E.;ESCUDEIRO, K. W., et al. Anchoring of CREB binding protein to the human T-cell leukemia virus type 1 promoter: a molecular mechanism of Tax transactivation. **Mol Cell Biol**, 17: 5156-64, 1997.

GILLI, S. C.;SALLES, T. S.;SAAD, S. T. Decreased GATA3 mRNA expression in human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection. **Scand J Infect Dis**, 32: 161-3, 2000.

GITLIN, S. D.;BOSELUT, R.;GEGONNE, A.;GHYSDAEL, J.;BRADY, J. N. Sequence-specific interaction of the Ets1 protein with the long terminal repeat of the human T-lymphotropic virus type I. **J Virol**, 65: 5513-23, 1991.

GOON, P. K.;HANON, E.;IGAKURA, T.;TANAKA, Y.;WEBER, J. N.;TAYLOR, G. P., et al. High frequencies of Th1-type CD4(+) T cells specific to HTLV-1 Env and Tax proteins in patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Blood**, 99: 3335-41, 2002.

GRASSMANN, R.;BERCHTOLD, S.;RADANT, I.;ALT, M.;FLECKENSTEIN, B.;SODROSKI, J. G., et al. Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. **J Virol**, 66: 4570-5, 1992.

Referências Bibliográficas

GRASSMANN, R.;FLECKENSTEIN, B. Selectable recombinant herpesvirus saimiri is capable of persisting in a human T-cell line. **J Virol**, 63: 1818-21, 1989.

GREGOIRE, J. M.;ROMEO, P. H. T-cell expression of the human GATA-3 gene is regulated by a non-lineage-specific silencer. **J Biol Chem**, 274: 6567-78, 1999.

HALL, W. W.;LIU, C. R.;SCHNEEWIND, O.;TAKAHASHI, H.;KAPLAN, M. H.;ROUPE, G., et al. Deleted HTLV-I provirus in blood and cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. **Science**, 253: 317-20, 1991.

HANNINK, M.;TEMIN, H. M. Structure and autoregulation of the c-rel promoter. **Oncogene**, 5: 1843-50, 1990.

HANNON, G. J.;BEACH, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. **Nature**, 371: 257-61, 1994.

HANNON, R.;EVANS, T.;FELSENFELD, G.;GOULD, H. Structure and promoter activity of the gene for the erythroid transcription factor GATA-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88: 3004-8, 1991.

HANON, E.;GOON, P.;TAYLOR, G. P.;HASEGAWA, H.;TANAKA, Y.;WEBER, J. N., et al. High production of interferon gamma but not interleukin-2 by human T-lymphotropic virus type I-infected peripheral blood mononuclear cells. **Blood**, 98: 721-6, 2001.

HANON, E.;HALL, S.;TAYLOR, G. P.;SAITO, M.;DAVIS, R.;TANAKA, Y., et al. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. **Blood**, 95: 1386-92, 2000.

Referências Bibliográficas

HARROD, R.;TANG, Y.;NICOT, C.;LU, H. S.;VASSILEV, A.;NAKATANI, Y., et al. An exposed KID-like domain in human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax is responsible for the recruitment of coactivators CBP/p300. **Mol Cell Biol**, 18: 5052-61, 1998.

HATTORI, N.;KAWAMOTO, H.;FUJIMOTO, S.;KUNO, K.;KATSURA, Y. Involvement of transcription factors TCF-1 and GATA-3 in the initiation of the earliest step of T cell development in the thymus. **J Exp Med**, 184: 1137-47, 1996.

HENDRIKS, R. W.;NAWIJN, M. C.;ENGEL, J. D.;VAN DOORNINCK, H.;GROSVELD, F.;KARIS, A. Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus. **Eur J Immunol**, 29: 1912-8, 1999.

HINUMA, Y.;NAGATA, K.;HANAOKA, M.;NAKAI, M.;MATSUMOTO, T.;KINOSHITA, K. I., et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 78: 6476-80, 1981.

HO, I. C.;VORHEES, P.;MARIN, N.;OAKLEY, B. K.; TSAI, S. F.;ORKIN, S. H., et al. Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the T cell receptor alpha gene. **Embo J**, 10: 1187-92, 1991.

HOCH, R. V.;THOMPSON, D. A.;BAKER, R. J.;WEIGEL, R. J. GATA-3 is expressed in association with estrogen receptor in breast cancer. **Int J Cancer**, 84: 122-8, 1999.

HOLLSBERG, P.;HAFLER, D. A. What is the pathogenesis of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? **Ann Neurol**, 37: 143-5, 1995.

Referências Bibliográficas

HOROWITZ, J. M.;FRIEND, S. H.;WEINBERG, R. A.;WHYTE, P.;BUCHKOVICH, K.;HARLOW, E. Anti-oncogenes and the negative regulation of cell growth. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, 53 Pt 2: 843-7, 1988.

ISHII, S.;XU, Y. H.;STRATTON, R. H.;ROE, B. A.;MERLINO, G. T.;PASTAN, I. Characterization and sequence of the promoter region of the human epidermal growth factor receptor gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 82: 4920-4, 1985.

JACOBSON, S.;SHIDA, H.;MCFARLIN, D. E.;FAUCI, A. S.;KOENIG, S. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. **Nature**, 348: 245-8, 1990.

JACQUEMIN, P.;OURY, C.;PEERS, B.;MORIN, A.;BELAYEW, A.;MARTIAL, J. A. Characterization of a single strong tissue-specific enhancer downstream from the three human genes encoding placental lactogen. **Mol Cell Biol**, 14: 93-103, 1994.

JANKNECHT, R.;HUNTER, T. Transcription. A growing coactivator network. **Nature**, 383: 22-3, 1996.

JEANG, K. T. Functional activities of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein: cellular signaling through NF-kappa B. **Cytokine Growth Factor Rev**, 12: 207-17, 2001.

JEANG, K. T.;WIDEN, S. G.;SEMMES, O. J. T.;WILSON, S. H. HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human beta-polymerase gene. **Science**, 247: 1082-4, 1990.

JIN, D. Y.;GIORDANO, V.;KIBLER, K. V.;NAKANO, H.;JEANG, K. T. Role of adapter function in oncoprotein-mediated activation of NF-kappaB. Human T-cell leukemia virus

Referências Bibliográficas

- type I Tax interacts directly with IkappaB kinase gamma. **J Biol Chem**, 274: 17402-5, 1999.
- JONES, K. A.;KADONAGA, J. T.;LUCIW, P. A.;TJIAN, R. Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Sp1. **Science**, 232: 755-9, 1986.
- JORCYK, C. L.;WATSON, D. K.;MAVROTHALASSITIS, G. J.;PAPAS, T. S. The human ETS1 gene: genomic structure, promoter characterization and alternative splicing. **Oncogene**, 6: 523-32, 1991.
- JOULIN, V.;BORIES, D.;ELEOUE, J. F.;LABASTIE, M. C.;CHRETIEN, S.;MATTEI, M. G., et al. A T-cell specific TCR delta DNA binding protein is a member of the human GATA family. **Embo J**, 10: 1809-16, 1991.
- KAJIYAMA, W.;KASHIWAGI, S.;IKEMATSU, H.;HAYASHI, J.;NOMURA, H.;OKOCHI, K. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. **J Infect Dis**, 154: 851-7, 1986.
- KAMIHARA, S.;NAKASIMA, S.;OYAKAWA, Y.;MORIUTI, Y.;ICHIMARU, M.;OKUDA, H., et al. Transmission of human T cell lymphotropic virus type I by blood transfusion before and after mass screening of sera from seropositive donors. **Vox Sang**, 52: 43-4, 1987.
- KANAZAWA, H.;IICHI, S.;EIRAKU, N.;IGAKURA, T.;HIGUCHI, I.;NAKAGAWA, M., et al. Behcet's disease and Sjogren syndrome in a patient with HTLV-I-associated myelopathy. **J Neurol Sci**, 119: 121-2, 1993.
- KANNAGI, M.;SHIDA, H.;IGARASHI, H.;KURUMA, K.;MURAI, H.;AONO, Y., et al. Target epitope in the Tax protein of human T-cell leukemia virus type I recognized by class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T cells. **J Virol**, 66: 2928-33, 1992.

Referências Bibliográficas

KAPLAN, J. E.;OSAME, M.;KUBOTA, H.;IGATA, A.;NISHITANI, H.;MAEDA, Y., et al. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. **J Acquir Immune Defic Syndr**, 3: 1096-101, 1990.

KATSUKI, T.;KATSUKI, K.;IMAI, J.;HINUMA, Y. Immune suppression in healthy carriers of adult T-cell leukemia retrovirus (HTLV-I): impairment of T-cell control of Epstein-Barr virus-infected B-cells. **Jpn J Cancer Res**, 78: 639-42, 1987.

KITAGAWA, T.;FUJISHITA, M.;TAGUCHI, H.;MIYOSHI, I.;TADOKORO, H. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. **Jama**, 256: 2342, 1986.

KO, L. J.;YAMAMOTO, M.;LEONARD, M. W.;GEORGE, K. M.;TING, P.;ENGEL, J. D. Murine and human T-lymphocyte GATA-3 factors mediate transcription through a cis-regulatory element within the human T-cell receptor delta gene enhancer. **Mol Cell Biol**, 11: 2778-84, 1991.

KOYANAGI, Y.;ITOYAMA, Y.;NAKAMURA, N.;TAKAMATSU, K.;KIRA, J.;IWAMASA, T., et al. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. **Virology**, 196: 25-33, 1993.

KURODA, Y.;MATSUI, M. Cerebrospinal fluid interferon-gamma is increased in HTLV-I-associated myelopathy. **J Neuroimmunol**, 42: 223-6, 1993.

KWOK, R. P.;LAURANCE, M. E.;LUNDBLAD, J. R.;GOLDMAN, P. S.;SHIH, H.;CONNOR, L. M., et al. Control of cAMP-regulated enhancers by the viral transactivator Tax through CREB and the co-activator CBP. **Nature**, 380: 642-6, 1996.

LABASTIE, M. C.;BORIES, D.;CHABRET, C.;GREGOIRE, J. M.;CHRETIEN, S.;ROMEO, P. H. Structure and expression of the human GATA3 gene. **Genomics**, 21: 1-6, 1994.

LANDRY, D. B.;ENGEL, J. D.;SEN, R. Functional GATA-3 binding sites within murine CD8 alpha upstream regulatory sequences. **J Exp Med**, 178: 941-9, 1993.

LEE, D. K.;KIM, B. C.;BRADY, J. N.;JEANG, K. T.;KIM, S. J. Human T-cell lymphotropic virus type 1 tax inhibits transforming growth factor-beta signaling by blocking the association of Smad proteins with Smad-binding element. **J Biol Chem**, 277: 33766-75, 2002.

LEE, M. E.;TEMIZER, D. H.;CLIFFORD, J. A.;QUERTERMOUS, T. Cloning of the GATA-binding protein that regulates endothelin-1 gene expression in endothelial cells. **J Biol Chem**, 266: 16188-92, 1991.

LEHKY, T. J.;FOX, C. H.;KOENIG, S.;LEVIN, M. C.;FLERLAGE, N.;IZUMO, S., et al. Detection of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by in situ hybridization. **Ann Neurol**, 37: 167-75, 1995.

LEIDEN, J. M. Transcriptional regulation of T cell receptor genes. **Annu Rev Immunol**, 11: 539-70, 1993.

LEMASSON, I.;ROBERT-HEBMANN, V.;HAMAIA, S.;DUC DODON, M.;GAZZOLO, L.;DEVAUX, C. Transrepression of lck gene expression by human T-cell leukemia virus type 1-encoded p40tax. **J Virol**, 71: 1975-83, 1997.

LEUNG, K.;NABEL, G. J. HTLV-1 transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF-kappa B-like factor. **Nature**, 333: 776-8, 1988.

Referências Bibliográficas

- LIEUW, K. H.;LI, G.;ZHOU, Y.;GROSVELD, F.;ENGEL, J. D. Temporal and spatial control of murine GATA-3 transcription by promoter-proximal regulatory elements. **Dev Biol**, 188: 1-16, 1997.
- LIN, L.;AGGARWAL, S.;GLOVER, T. W.;ORRINGER, M. B.;HANASH, S.;BEER, D. G. A minimal critical region of the 8p22-23 amplicon in esophageal adenocarcinomas defined using sequence tagged site-amplification mapping and quantitative polymerase chain reaction includes the GATA-4 gene. **Cancer Res**, 60: 1341-7, 2000.
- LOWRY, J. A.;ATCHLEY, W. R. Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain. **J Mol Evol**, 50: 103-15, 2000.
- MADOR, N.;PANET, A.;HONIGMAN, A. Translation of gag, pro, and pol gene products of human T-cell leukemia virus type 2. **J Virol**, 63: 2400-4, 1989.
- MANTOVANI, R.;MALGARETTI, N.;NICOLIS, S.;GIGLIONI, B.;COMI, P.;CAPPELLINI, N., et al. An erythroid specific nuclear factor binding to the proximal CACCC box of the beta-globin gene promoter. **Nucleic Acids Res**, 16: 4299-313, 1988.
- MARINE, J.;WINOTO, A. The human enhancer-binding protein Gata3 binds to several T-cell receptor regulatory elements. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88: 7284-8, 1991.
- MARRIOTT, S. J.;TRINH, D.;BRADY, J. N. Activation of interleukin-2 receptor alpha expression by extracellular HTLV-I Tax1 protein: a potential role in HTLV-I pathogenesis. **Oncogene**, 7: 1749-55, 1992.
- MARTIN, D. I.;ZON, L. I.;MUTTER, G.;ORKIN, S. H. Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. **Nature**, 344: 444-7, 1990.

Referências Bibliográficas

MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia. **Oncogene**, 22: 5131-40, 2003.

MEYTES, D.;SCHOCHAT, B.;LEE, H.;NADEL, G.;SIDL, Y.;CERNEY, M., et al. Serological and molecular survey for HTLV-I infection in a high-risk Middle Eastern group. **Lancet**, 336: 1533-5, 1990.

MIYATAKE, S.;SEIKI, M.;MALEFIJT, R. D.;HEIKE, T.;FUJISAWA, J.;TAKEBE, Y., et al. Activation of T cell-derived lymphokine genes in T cells and fibroblasts: effects of human T cell leukemia virus type I p40x protein and bovine papilloma virus encoded E2 protein. **Nucleic Acids Res**, 16: 6547-66, 1988.

MOCHIZUKI, M.;WATANABE, T.;YAMAGUCHI, K.;TAJIMA, K.;YOSHIMURA, K.;NAKASHIMA, S., et al. Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical, and virologic studies. **J Infect Dis**, 166: 943-4, 1992.

MORGAN, O. S.;RODGERS-JOHNSON, P.;MORA, C.;CHAR, G. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. **Lancet**, 2: 1184-7, 1989.

MORI, N.;MORISHITA, M.;TSUKAZAKI, T.;GIAM, C. Z.;KUMATORI, A.;TANAKA, Y., et al. Human T-cell leukemia virus type I oncoprotein Tax represses Smad-dependent transforming growth factor beta signaling through interaction with CREB-binding protein/p300. **Blood**, 97: 2137-44, 2001.

MURPHY, E. L.;HANCHARD, B.;FIGUEROA, J. P.;GIBBS, W. N.;LOFTERS, W. S.;CAMPBELL, M., et al. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. **Int J Cancer**, 43: 250-3, 1989.

Referências Bibliográficas

- NAKAMURA, H.;EGUCHI, K.;NAKAMURA, T.;MIZOKAMI, A.;SHIRABE, S.;KAWAKAMI, A., et al. High prevalence of Sjogren's syndrome in patients with HTLV-I associated myelopathy. **Ann Rheum Dis**, 56: 167-72, 1997.
- NAKAMURA, S.;NAGANO, I.;YOSHIOKA, M.;SHIMAZAKI, S.;ONODERA, J.;KOGURE, K. Detection of tumor necrosis factor-alpha-positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. **J Neuroimmunol**, 42: 127-30, 1993.
- NEVINS, J. R. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. **Science**, 258: 424-9, 1992.
- NISHIOKA, K.;NAKAJIMA, T.;HASUNUMA, T.;SATO, K. Rheumatic manifestation of human leukemia virus infection. **Rheum Dis Clin North Am**, 19: 489-503, 1993.
- NISHIURA, Y.;NAKAMURA, T.;ICHINOSE, K.;SHIRABE, S.;TSUJINO, A.;GOTO, H., et al. Increased production of inflammatory cytokines in cultured CD4+ cells from patients with HTLV-I-associated myelopathy. **Tohoku J Exp Med**, 179: 227-33, 1996.
- NOGUEIRA, C. M.;CAVALCANTI, M.;SCHECHTER, M.;FERREIRA, O. C., JR. Human T lymphotropic virus type I and II infections in healthy blood donors from Rio de Janeiro, Brazil. **Vox Sang**, 70: 47-8, 1996.
- NYAMBI, P. N.;VILLE, Y.;LOUWAGIE, J.;BEDJABAGA, I.;GLOWACZOWER, E.;PEETERS, M., et al. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I/II) in Gabon: a prospective follow-up of 4 years. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, 12: 187-92, 1996.
- OKOCHI, K.;SATO, H.;HINUMA, Y. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. **Vox Sang**, 46: 245-53, 1984.

Referências Bibliográficas

OOSTERWEGEL, M.;TIMMERMAN, J.;LEIDEN, J.;CLEVERS, H. Expression of GATA-3 during lymphocyte differentiation and mouse embryogenesis. **Dev Immunol**, 3: 1-11, 1992.

OSAME, M.;MATSUMOTO, M.;USUKU, K.;IZUMO, S.;IJICHI, N.;AMITANI, H., et al. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T-lymphotropic virus type I and adult T-cell leukemia-like cells. **Ann Neurol**, 21: 117-22, 1987.

OUYANG, W.;RANGANATH, S. H.;WEINDEL, K.;BHATTACHARYA, D.;MURPHY, T. L.;SHA, W. C., et al. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. **Immunity**, 9: 745-55, 1998.

PAHL, H. L.;BURN, T. C.;TENEN, D. G. Optimization of transient transfection into human myeloid cell lines using a luciferase reporter gene. **Exp Hematol**, 19: 1038-41, 1991.

PANDOLFI, P. P.;ROTH, M. E.;KARIS, A.;LEONARD, M. W.;DZIERZAK, E.;GROSVELD, F. G., et al. Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. **Nat Genet**, 11: 40-4, 1995.

PARKER, C. E.;DAENKE, S.;NIGHTINGALE, S.;BANGHAM, C. R. Activated, HTLV-1-specific cytotoxic T-lymphocytes are found in healthy seropositives as well as in patients with tropical spastic paraparesis. **Virology**, 188: 628-36, 1992.

PARKER, C. E.;NIGHTINGALE, S.;TAYLOR, G. P.;WEBER, J.;BANGHAM, C. R. Circulating anti-Tax cytotoxic T lymphocytes from human T-cell leukemia virus type I-

- infected people, with and without tropical spastic paraparesis, recognize multiple epitopes simultaneously. **J Virol**, 68: 2860-8, 1994.
- PATEY, O.;GESSAIN, A.;BREUIL, J.;COURILLON-MALLET, A.;DANIEL, M. T.;MICLEA, J. M., et al. Seven years of recurrent severe strongyloidiasis in an HTLV-I-infected man who developed adult T-cell leukaemia. **Aids**, 6: 575-9, 1992.
- PATIENT, R. K.;MCGHEE, J. D. The GATA family (vertebrates and invertebrates). **Curr Opin Genet Dev**, 12: 416-22, 2002.
- PAUL, R.;SCHUETZE, S.;KOZAK, S. L.;KABAT, D. A common site for immortalizing proviral integrations in Friend erythroleukemia: molecular cloning and characterization. **J Virol**, 63: 4958-61, 1989.
- POIESZ, B. J.;RUSCETTI, F. W.;GAZDAR, A. F.;BUNN, P. A.;MINNA, J. D.;GALLO, R. C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 77: 7415-9, 1980.
- POPOVIC, M.;FLOMENBERG, N.;VOLKMAN, D. J.;MANN, D.;FAUCI, A. S.;DUPONT, B., et al. Alteration of T-cell functions by infection with HTLV-I or HTLV-II. **Science**, 226: 459-62, 1984.
- POSTIGO, A. A. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. **Embo J**, 22: 2443-52, 2003.
- POSTIGO, A. A.;DEAN, D. C. ZEB, a vertebrate homolog of Drosophila Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation. **Embo J**, 16: 3935-43, 1997.

POSTIGO, A. A.;DEPP, J. L.;TAYLOR, J. J.;KROLL, K. L. Regulation of Smad signaling through a differential recruitment of coactivators and corepressors by ZEB proteins. **Embo J**, 22: 2453-62, 2003.

POSTIGO, A. A.;SHEPPARD, A. M.;MUCENSKI, M. L.;DEAN, D. C. c-Myb and Ets proteins synergize to overcome transcriptional repression by ZEB. **Embo J**, 16: 3924-34, 1997.

RANGANATH, S.;OUYANG, W.;BHATTARCHARYA, D.;SHA, W. C.;GRUPE, A.;PELTZ, G., et al. GATA-3-dependent enhancer activity in IL-4 gene regulation. **J Immunol**, 161: 3822-6, 1998.

RICHARDSON, J. H.;EDWARDS, A. J.;CRUICKSHANK, J. K.;RUDGE, P.;DALGLEISH, A. G. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. **J Virol**, 64: 5682-7, 1990.

RUBEN, S.;POTEAT, H.;TAN, T. H.;KAWAKAMI, K.;ROEDER, R.;HASELTINE, W., et al. Cellular transcription factors and regulation of IL-2 receptor gene expression by HTLV-I tax gene product. **Science**, 241: 89-92, 1988.

SAGAWA, K.;MOCHIZUKI, M.;KATAGIRI, K.;TSUBOI, I.;SUGITA, S.;MUKAIDA, N., et al. In vitro effects of immunosuppressive agents on cytokine production by HTLV-I-infected T cell clones derived from the ocular fluid of patients with HTLV-I uveitis. **Microbiol Immunol**, 40: 373-9, 1996.

SANGER, F.;NICKLEN, S.;COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 74: 5463-7, 1977.

- SCHLEGEL, R.;WADE-GLASS, M.;RABSON, M. S.;YANG, Y. C. The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encodes a small, hydrophobic polypeptide. **Science**, 233: 464-7, 1986.
- SEIKI, M.;HATTORI, S.;HIRAYAMA, Y.;YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 80: 3618-22, 1983.
- SHIGA, K.;SHIGA, C.;SASANO, H.;MIYAZAKI, S.;YAMAMOTO, T.;YAMAMOTO, M., et al. Expression of c-erbB-2 in human esophageal carcinoma cells: overexpression correlated with gene amplification or with GATA-3 transcription factor expression. **Anticancer Res**, 13: 1293-301, 1993.
- SHIMOTOHNO, K.;TAKAHASHI, Y.;SHIMIZU, N.;GOJOBORI, T.;GOLDE, D. W.;CHEN, I. S., et al. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 82: 3101-5, 1985.
- SHIMOYAMA, M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). **Br J Haematol**, 79: 428-37, 1991.
- SIEKEVITZ, M.;FEINBERG, M. B.;HOLBROOK, N.;WONG-STAAAL, F.;GREENE, W. C. Activation of interleukin 2 and interleukin 2 receptor (Tac) promoter expression by the trans-activator (tat) gene product of human T-cell leukemia virus, type I. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 84: 5389-93, 1987.
- SINGHAL, B. S.;LALKAKA, J. A.;SONODA, S.;HASHIMOTO, K.;NOMOTO, M.;KUBOTA, R., et al. Human T-lymphotropic virus type I infections in western India. **Aids**, 7: 138-9, 1993.

SLAMON, D. J.;SHIMOTOHNO, K.;CLINE, M. J.;GOLDE, D. W.;CHEN, I. S. Identification of the putative transforming protein of the human T-cell leukemia viruses HTLV-I and HTLV-II. **Science**, 226: 61-5, 1984.

STEENBERGEN, R. D.;OUDEENGBERINK, V. E.;KRAMER, D.;SCHRIJNEMAKERS, H. F.;VERHEIJEN, R. H.;MEIJER, C. J., et al. Down-regulation of GATA-3 expression during human papillomavirus-mediated immortalization and cervical carcinogenesis. **Am J Pathol**, 160: 1945-51, 2002.

SUZUKI, T.;FUJISAWA, J. I.;TOITA, M.;YOSHIDA, M. The trans-activator tax of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) interacts with cAMP-responsive element (CRE) binding and CRE modulator proteins that bind to the 21-base-pair enhancer of HTLV-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 90: 610-4, 1993.

SUZUKI, T.;KITAO, S.;MATSUSHIME, H.;YOSHIDA, M. HTLV-1 Tax protein interacts with cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4A and counteracts its inhibitory activity towards CDK4. **Embo J**, 15: 1607-14, 1996.

SUZUKI, T.;NARITA, T.;UCHIDA-TOITA, M.;YOSHIDA, M. Down-regulation of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors by tax protein of HTLV-1 through two distinct mechanisms. **Virology**, 259: 384-91, 1999a.

SUZUKI, T.;UCHIDA-TOITA, M.;YOSHIDA, M. Tax protein of HTLV-1 inhibits CBP/p300-mediated transcription by interfering with recruitment of CBP/p300 onto DNA element of E-box or p53 binding site. **Oncogene**, 18: 4137-43, 1999b.

SZABO, S. J.;DIGHE, A. S.;GUBLER, U.;MURPHY, K. M. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. **J Exp Med**, 185: 817-24, 1997.

Referências Bibliográficas

TACHIBANA, N.;OKAYAMA, A.;ISHIZAKI, J.;YOKOTA, T.;SHISHIME, E.;MURAI, K., et al. Suppression of tuberculin skin reaction in healthy HTLV-I carriers from Japan. **Int J Cancer**, 42: 829-31, 1988.

TAJIMA, K.;KUROISHI, T. Estimation of rate of incidence of ATL among ATL (HTLV-I) carriers in Kyushu, Japan. **Jpn J Clin Oncol**, 15: 423-30, 1985.

TAKATSUKI, K.;YAMAGUCHI, K.;KAWANO, F.;HATTORI, T.;NISHIMURA, H.;TSUDA, H., et al. Clinical diversity in adult T-cell leukemia-lymphoma. **Cancer Res**, 45: 4644s-5s, 1985.

TIE, F.;ADYA, N.;GREENE, W. C.;GLAM, C. Z. Interaction of the human T-lymphotropic virus type 1 Tax dimer with CREB and the viral 21-base-pair repeat. **J Virol**, 70: 8368-74, 1996.

TING, C. N.;OLSON, M. C.;BARTON, K. P.;LEIDEN, J. M. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. **Nature**, 384: 474-8, 1996.

TOKUDOME, S.;TOKUNAGA, O.;SHIMAMOTO, Y.;MIYAMOTO, Y.;SUMIDA, I.;KIKUCHI, M., et al. Incidence of adult T-cell leukemia/lymphoma among human T-lymphotropic virus type I carriers in Saga, Japan. **Cancer Res**, 49: 226-8, 1989.

TSAL, S. F.;STRAUSS, E.;ORKIN, S. H. Functional analysis and in vivo footprinting implicate the erythroid transcription factor GATA-1 as a positive regulator of its own promoter. **Genes Dev**, 5: 919-31, 1991.

UCHIYAMA, T. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. **Annu Rev Immunol**, 15: 15-37, 1997.

Referências Bibliográficas

- UCHIYAMA, T.;YODOI, J.;SAGAWA, K.;TAKATSUKI, K.;UCHINO, H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. **Blood**, 50: 481-92, 1977.
- UMEHARA, F.;IZUMO, S.;RONQUILLO, A. T.;MATSUMURO, K.;SATO, E.;OSAME, M. Cytokine expression in the spinal cord lesions in HTLV-I-associated myelopathy. **J Neuropathol Exp Neurol**, 53: 72-7, 1994.
- VERNANT, J. C.;MAURS, L.;GESSAIN, A.;BARIN, F.;GOUT, O.;DELAPORTE, J. M., et al. Endemic tropical spastic paraparesis associated with human T-lymphotropic virus type I: a clinical and seroepidemiological study of 25 cases. **Ann Neurol**, 21: 123-30, 1987.
- WELLES, S. L.;TACHIBANA, N.;OKAYAMA, A.;SHIOIRI, S.;ISHIHARA, S.;MURAI, K., et al. Decreased reactivity to PPD among HTLV-I carriers in relation to virus and hematologic status. **Int J Cancer**, 56: 337-40, 1994.
- WHYTE, P.;RULEY, H. E.;HARLOW, E. Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. **J Virol**, 62: 257-65, 1988.
- WIKTOR, S. Z.;PIOT, P.;MANN, J. M.;NZILAMBI, N.;FRANCIS, H.;VERCAUTEREN, G., et al. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) among female prostitutes in Kinshasa, Zaire. **J Infect Dis**, 161: 1073-7, 1990.
- YAMADA, Y.;OHMOTO, Y.;HATA, T.;YAMAMURA, M.;MURATA, K.;TSUKASAKI, K., et al. Features of the cytokines secreted by adult T cell leukemia (ATL) cells. **Leuk Lymphoma**, 21: 443-7, 1996.
- YAMAGATA, T.;MITANI, K.;ODA, H.;SUZUKI, T.;HONDA, H.;ASAI, T., et al. Acetylation of GATA-3 affects T-cell survival and homing to secondary lymphoid organs. **Embo J**, 19: 4676-87, 2000.

YAMAGUCHI, K.;NISHIMURA, H.;KAWANO, F.;KOHROGI, H.;JONO, M.;MIYAMOTO, Y., et al. A proposal for smoldering adult T-cell leukemia--diversity in clinical pictures of adult T-cell leukemia. **Jpn J Clin Oncol**, 13 Suppl 2: 189-99, 1983.

YAMAMOTO, M.;KO, L. J.;LEONARD, M. W.;BEUG, H.;ORKIN, S. H.;ENGEL, J. D. Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. **Genes Dev**, 4: 1650-62, 1990.

YANAGIHARA, R.;JENKINS, C. L.;ALEXANDER, S. S.;MORA, C. A.;GARRUTO, R. M. Human T lymphotropic virus type I infection in Papua New Guinea: high prevalence among the Hagahai confirmed by western analysis. **J Infect Dis**, 162: 649-54, 1990.

YANG, Z.;ENGEL, J. D. Human T cell transcription factor GATA-3 stimulates HIV-1 expression. **Nucleic Acids Res**, 21: 2831-6, 1993.

YARCHOAN, R.;GUO, H. G.;REITZ, M., JR.;MALUISH, A.;MITSUYA, H.;BRODER, S. Alterations in cytotoxic and helper T cell function after infection of T cell clones with human T cell leukemia virus, type I. **J Clin Invest**, 77: 1466-73, 1986.

YOSHIDA, M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. **Annu Rev Immunol**, 19: 475-96, 2001.

ZHANG, D. H.;COHN, L.;RAY, P.;BOTTOMLY, K.;RAY, A. Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. **J Biol Chem**, 272: 21597-603, 1997.

ZHANG, D. H.;YANG, L.;RAY, A. Differential responsiveness of the IL-5 and IL-4 genes to transcription factor GATA-3. **J Immunol**, 161: 3817-21, 1998.

Referências Bibliográficas

ZHAO, L. J.;GIAM, C. Z. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator, Tax, enhances CREB binding to HTLV-I 21-base-pair repeats by protein-protein interaction. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 89: 7070-4, 1992.

ZHAO, L. J.;GIAM, C. Z. Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator Tax with cellular factors that bind specifically to the 21-base-pair repeats in the HTLV-I enhancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 88: 11445-9, 1991.

ZHENG, W.;FLAVELL, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. **Cell**, 89: 587-96, 1997.

ZUCKER-FRANKLIN, D.;PANCAKE, B. A. Human T-cell lymphotropic virus type 1 tax among American blood donors. **Clin Diagn Lab Immunol**, 5: 831-5, 1998.

ANEXO I

Decreased GATA3 mRNA Expression in Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Infection

SIMONE C. O. GILLI, TEREZA S. I. SALLES and SARA T. O. SAAD

From the Hemocentro and Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

GATA3 is a specific T-cell transcription factor involved in the expression of T-cell receptor (TCR). In order to characterize the relationship between HTLV-1 infection, which has been reported to be associated with down-regulation of genes belonging to the TCR/CD3 complex, and the transcription factor GATA3, we evaluated, by semi-quantitative RT-PCR, the expression of GATA3 gene in HTLV-1 carriers and individuals with related diseases. The study included 4 asymptomatic carriers, 2 patients with adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATLL), 1 patient with HTLV-1 associated myelopathy (HAM)/tropical spastic paraparesis (TSP) and 7 healthy blood donors. A considerable decrease in the expression of the GATA3 mRNA was observed in all subjects infected by HTLV-1 and no expression of GATA3 mRNA was observed in 1 subject with ATLL and in 1 with HAM/TSP.

S. T. O. Saad, MD, Hemocentro – UNICAMP, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”, Distrito de Barão Geraldo, CP 6198, Campinas – São Paulo, CEP 13083-970, Brazil

INTRODUCTION

The human T-cell lymphotropic virus type 1 has been implicated as the aetiological agent of adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATLL) and of a degenerative neurological disorder known as HTLV-1 associated myelopathy (HAM) or tropical spastic paraparesis (TSP). In addition to parenteral transmission by blood transfusion, from mother to child, and among intravenous drug users, HTLV-1 can also be sexually transmitted.

Although the infection has been reported in virtually every region of the world, particularly high rates of infection can be found in parts of South America. Exposure to the virus leads to a persistent infection that rarely results in disease progression. The majority of seropositive individuals (more than 95%) remain asymptomatic. Factors causing progression of the disease are unknown, but might include genetic disposition, different viral strains and differences in the host immune response (1).

Several lines of evidence suggest that the HTLV-1 transactivator protein Tax mediates the transcriptional activation of many genes involved in cytokine production or response and cell proliferation, such as c-fos, c-myc, erg-1, IL-1, IL-2, GM-CSF (2). Deregulation of T-cell proliferation by HTLV-1 has therefore been implicated in leukaemogenesis. The transcription factor GATA3 is abundantly expressed during T lymphocyte differentiation and is an essential factor and specific regulator of early thymocyte development. GATA3 binding sites have been identified in regulatory regions of T-cell receptors (TCR) and other early T-cell genes, including TCF-1 and/or RAG-1 and RAG-2 (3). However, the relationship between HTLV-1 infection and the transcription factor GATA3 has not yet been described.

The aim of the present study was to characterize the role of GATA3 in HTLV-1 infection through the expression of the GATA3 mRNA.

MATERIALS AND METHODS

The study included 14 individuals seen at the University Hospital of Campinas: 4 asymptomatic HTLV-1 carriers (blood donors), 2 patients with ATLL (the diagnosis was based on clinical features, immunophenotypes and HTLV-1 antibody), 1 patient with HAM/TSP (clinicopathological diagnosis) and 7 healthy blood donors. This study was approved by the ethics committee of the University Hospital.

The diagnosis of HTLV-1 was carried out by ELISA (kit, Organon Teknika, Boxtel, The Netherlands) and confirmed by Western blotting (HTLV-1 2.4 Genelabs Diagnostics, Singapore) and/or PCR analyses. The PCR amplification was carried out using the primers SK110/SK111 and the PCR product was hybridized with ³²P-labelled probes SK112/SK188. For CD4/CD8 quantitation the lymphocyte population was gated according to side scatter and forward scatter in flow-cytometric analysis. The percentages of positive cells for each monoclonal antibody were assayed with FACScan (Becton Dickinson ICS Inc., Mountain View, CA, USA).

Semiquantitative PCR

For RNA isolation 20 ml of whole blood was collected using citrate as anticoagulant, and the lysis of red blood cells was performed with NH₄Cl (0.144 M) and NH₄HCO₃ (0.01 M). Total RNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), by the guanidine isothiocyanate phenol chloroform method (4).

RNA (4 µl) was reverse-transcribed into cDNA to a final volume of 30 µl containing 60 U of AMV Reverse Transcriptase (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK), 5 µl oligo dT (Life Technologies, Gaithersburg, USA), reverse transcription buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 40 mM MgCl₂, 250 mM NaCl and DTT), 30 U of RNA inhibitor (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) and 3 µM each dATP, dCTP, dGTP and dTTP. The reaction sample was incubated at 42°C for 60 min and 52°C for

30 min and was further precipitated with 3 M sodium acetate pH 5.2 and ethanol, at -70°C overnight. cDNA was amplified into a single tube by PCR using the following primers: GATA3 sense 5'AAGGCATCCAGACCAGAAAC3' (region 1256-1276), GATA3 antisense 5'GTAAACGAGCTGTTC-TTGGG 3' (region 1339-1359); β globin sense 5'AGACAGAGAAGACTCTTG 3' (region IVS-1) and β globin anti-sense 5'TCATTCTGTC-TGTTTCCCATTC 3' (region IVS-2). The reaction volume was 50 μl containing 4 μl cDNA sample, 1 $\times$ CR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4; 500 mM KCl), 4.0 mM MgCl_2 , 100 μM each dATP, dCTP, dGTP and dTTP, and 2.5 U Taq DNA polymerase (Life Technologies, Gaithersburg, USA).

Amplification was performed in a Perkin Elmer Thermo-cycler (Connecticut, USA) using the following program: denaturation at 92°C for 30 s, primer annealing at 58°C for 30 s and primer extension at 72°C for 30 s. After the reaction, 5 μl of the sample was electrophoresed through a gel containing 1.6% agarose and ethidium bromide. The amplified cDNA product was 101 bp for GATA3 and 411 bp for β globin. In order to choose the best number of cycles for determination of the GATA3 mRNA amount, after 20 cycles, the reaction mixture was withdrawn every 3 cycles and the amplified DNA fragments were analysed by gel electrophoresis. After 35 cycles, the bands of GATA3 and β globin obtained a cumulative result, without reaching the plateau. The reactions were performed at least 3 times in independent experiments. The relative amount of GATA3 mRNA was calculated through the densitometric scanning of the ethidium bromide stained bands using the EagleSight Stratagene program, version 3.2 (La Jolla, USA) and the results were presented as the relative amount of GATA3 cDNA to β globin cDNA.

RESULTS

The results, expressed a mean $\pm$ standard deviation, of GATA3/ β globin mRNA ratios were: healthy donors = 0.42 ± 0.07 , asymptomatic carriers = 0.24 ± 0.09 and patients = 0.07 ± 0.106 . Thus there was a clear reduction of GATA3 mRNA in subjects infected by HTLV-1 compared with controls. There was no expression of GATA3 mRNA in 1 subject with ATLL and another with HAM/TSP (Fig. 1).

The flow cytometric analysis demonstrated a normal ratio of CD4/CD8 cells in asymptomatic carriers and blood donors and an evident malignant proliferation of CD4 cells in leukaemic subjects (Table 1). The HAM/TSP patient was not analysed for T-cell subsets.

DISCUSSION

The transcription factor GATA3 was first identified by its DNA sequence homology to GATA1, the first member of the GATA family of transcription factors to be cloned. GATA3 was initially reported to be extremely restricted in its expression pattern, but subsequently, a more detailed examination revealed abundant accumulation in a number of distinct sites during development, including the placenta, the kidney and adrenal gland, the embryonic and adult central and peripheral nervous systems, the embryonic liver and T lymphocytes. The targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in foetal liver haematopoiesis. So far, target genes that are

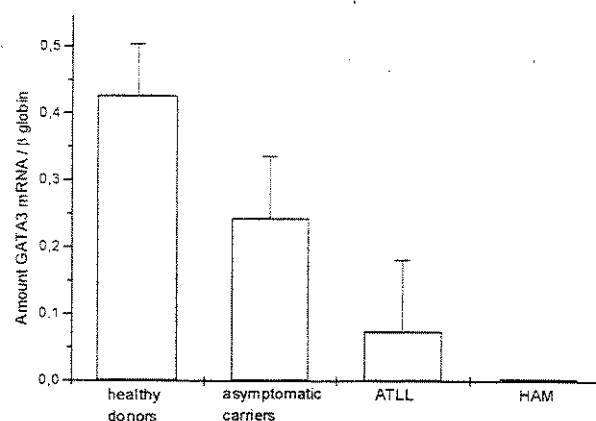


Fig. 1. GATA3 mRNA expression in HTLV-1-infected patients and controls. Results are expressed as GATA3/ β globin mRNA ratios. Vertical bases indicate SD. ATLL: Adult T-cell leukaemia/lymphoma; HAM: HTLV-1 associated myelopathy.

directly regulated by GATA3 have been identified only in T lymphocytes (5).

The relationship between GATA3 and HTLV-1 and its role in the pathogenesis of the related diseases, ATLL and HAM/TSP, has not been described previously. The present results indicated a clear decreased GATA3 mRNA expression in infected individuals, which was even more evident in patients with ATLL and HAM/TSP. The mechanism involved is not clear, however the transcription of GATA3 might be deregulated by the viral product Tax, as previously described for other transcription factors (2). The relationship between decreased GATA3 mRNA expression and T-cell leukaemia might be explained by the finding that GATA3 is an important transcription factor for TCR genes (TCR α , TCR β and TCR γ) and in conjunction with other T-cell-specific enhancer-binding factors, such as TCF-1 and TCF-1 α , may then determine the tissue-specific regulation

Table 1. Quantification of the lymphocyte T population

Individual	Total T-cells (CD3/CD4 + CD3/CD8)/mm ³
HD1	1422
HD2	1090
HD3	1798
HD4	1351
HD5	1053
HD6	1027
HD7	2224
AC1	1285
AC2	1106
AC3	957
ATLL 1	8920
ATLL 2	308352

* T-cell normal values: 800–2300 mm³.

HD = healthy donors; AC = asymptomatic carriers; ATLL = adult T-cell leukaemia/lymphoma.

of various T-cell development genes (6). Therefore a failure of TCR β transcription (3), might lead to a reduction of TCR CD3 complex formation, previously found in the HTLV-1 infection (7), and could contribute to the escape of HTLV-1 transformed T-cell from normal growth control. Therefore, the relationship of the TCR complex to development of ATLL might also be suggested by the finding of TCR δ locus deletion in all patients with ATLL described by Isobe et al. (8).

GATA3 is also important for the development of the central nervous system and peripheral nervous system according to the data obtained in knockout GATA3 mice (5). However, the relationship between the development of HAM/TSP and the decreased mRNA expression of GATA3 has yet to be clarified.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Professor Irene G. H. Lorand-Metze for her contribution to the flow cytometric analyses.

REFERENCES

1. Utz U, Banks D, Jacobson S, Biddison WE. Analysis of the T-cell receptor repertoire of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) tax-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocytes from patients with HTLV-1-associated disease: evidence for oligoclonal expansion. *J Virol* 1996; 70: 843–51.
2. Ferreira OC, Planelles V, Rosenblatt JD. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. *Blood Reviews* 1997; 11: 91–104.
3. Ting CN, Olson MC, Barton KP, Leidin JM. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage. *Nature* 1996; 384: 474–8.
4. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–9.
5. Pandolfi PP, Roth ME, Karis A, Leonard MW, Dzierzak E, Grosveld FG, et al. Target disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in foetal liver haematopoiesis. *Nature Genetics* 1995; 11: 41–4.
6. Marine J, Winoto A. The human enhancer-binding protein Gata3 binds to several T-cell receptor regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7284–8.
7. Malefyt RW, Yssel H, Spits H, Vries JE, Sancho J, Terhorst C, et al. Human T-cell leukemia virus type I prevents cell surface expression of the T-cell receptor through down-regulation of the CD3- γ , - δ , - ϵ and - ζ genes. *J Immunol* 1990; 145: 2297–303.
8. Sadamori N. Cytogenetic implication in adult T-cell leukemia. A hypothesis of leukemogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 51: 131–6.

Submitted April 7, 1999; accepted August 24, 1999