

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto De Ciências Biológicas - Icb

Departamento De Microbiologia

Programa De Pós-Graduação Em Microbiologia

João Leite Costa Prado

**CONSTRUÇÃO DE VÍRUS RECOMBINANTE NA PLATAFORMA MVA
EXPRESSANDO PEPTÍDEOS HBZ DO HTLV-1:
geração de candidatos à vacina terapêutica**

Belo Horizonte
2018

João Leite Costa Prado

**CONSTRUÇÃO DE VÍRUS RECOMBINANTE NA PLATAFORMA MVA
EXPRESSANDO PEPTÍDEOS HBZ DO HTLV-1:
Geração de candidatos à vacina terapêutica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Mestre em Microbiologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª.: Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Belo Horizonte
2018

043

Prado, João Leite Costa.

Construção de vírus recombinante na plataforma MVA expressando peptídeos HBZ do HTLV-1: geração de candidatos à vacina terapêutica [manuscrito] / João Leite Costa Prado. – 2018.

114 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof^a. Dr^a.: Edel Figueiredo Barbosa Stancioli.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Vírus Linfotrópico T Tipo 1 Humano. 3. Vacinas. I. Stancioli, Edel Figueiredo Barbosa. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE JOAO LEITE COSTA PRADO

Nº REGISTRO: 2016656047

Relator e Suplente: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Às 08:30 horas do dia 27 de fevereiro de 2018, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Barbara Resende Quinan (UFMG), Marina Lobato Martins de Oliveira (Fundação Hemominas) e a Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli - Orientadora, para julgar o trabalho final "Construção de vírus recombinante na plataforma MVA expressando peptídeos HBZ do HTLV-1: Geração de candidatos à vacina terapêutica", do aluno **João Leite Costa Prado**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O candidato foi considerado **APROVADO**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 27 de fevereiro de 2018.

Profª. Drª. Barbara Resende Quinan

Prof. Dr. Marina Lobato Martins de Oliveira

Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli (Orientadora)

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca
Coordenador

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade oferecida.

À Professora Dr. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli, por ter me acolhido como estudante de Mestrado, pelo suporte, confiança, dedicação e conhecimentos transmitidos na realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Flávio Guimarães da Fonseca pela colaboração e direcionamento na execução deste projeto.

À Tânia Mara, pelo tempo, disposição e paciência no ensinamento e execução de técnicas utilizados no presente trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Virologia Básica e Aplicada pelo incentivo e contribuição no desenvolvimento da pesquisa. Especialmente às amigas Gaby, Karine e Lethícia, pela amizade e pelo companheirismo dentro e fora do laboratório. Aos amigos Anderson e Flávia, pela companhia durante este período. Aos colegas Ângela, Raissa e Thiago, pela ajuda no planejamento e execução de experimentos.

Aos meus pais, Marília e João Leite, e irmãs Livia e Laís, pelo apoio e incentivo, não somente durante a pós-graduação, mas durante toda vida. Ao meu avô Paito e minha tia Dora, por acreditarem em mim e sempre me ajudarem.

Aos membros da banca examinadora por terem aceitado o convite de avaliar este trabalho e pelas colaborações que serão bem-vindas.

RESUMO

O *Human T-lymphotropic virus 1* (Vírus linfotrópico de células T humanas - HTLV-1) é um retrovírus que infecta entre 5 a 10 milhões de pessoas no mundo. O Brasil é um país endêmico para o HTLV-1 e apresenta cerca de 2,5 milhões de pessoas infectadas, sendo detentor do maior número absoluto de pessoas infectadas no mundo. O vírus infecta principalmente células TCD4⁺ e estabelece uma infecção crônica que pode resultar em diferentes desfechos. A maioria dos portadores são assintomáticos, porém cerca de 5% dos infectados apresentam patologias desencadeadas pela infecção, como a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL), e a doença neurodegenerativa, mielopatia associada à HTLV / paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). O HTLV-1 possui algumas proteínas regulatórias que são cruciais no desenvolvimento da patogênese e na cronificação da infecção, destacando-se a proteína HBZ. Esta é capaz de induzir a proliferação celular e a evasão do sistema imunológico, que tem como resultado a persistência viral, importante no desencadeamento das doenças. Apesar da relevância desta infecção, ainda não existe nenhuma terapia eficiente e segura para o tratamento das doenças e para o controle da infecção pelo HTLV-1. Desta forma este trabalho se propôs a desenvolver um potencial candidato a vacina terapêutica contra o HTLV-1, baseado em vetores virais. Com base em análises *in silico* e na literatura, houve a identificação de epitopos da proteína HBZ com potencial imunogênico para a modulação de respostas celulares, hipoteticamente passível de induzir células T citotóxicas específicas para HBZ, capazes de lisar células infectadas e desta forma, auxiliar no controle da infecção, impedindo ou retardando a evolução das doenças causadas por HTLV-1. Desse modo, foram desenhados dois cassetes gênicos para a produção de duas proteínas multiepitopo contendo os peptídeos selecionados, sendo uma delas com a adição de um peptídeo sinal. Os candidatos à vacina terapêutica foram gerados na plataforma do vetor viral *Vaccinia* Ankara Modificado (MVA), um promissor vetor utilizado no desenvolvimento de vacinas. As construções foram realizadas com sucesso, sendo confirmadas, após as expansões clonais, pelo sequenciamento dos vírus recombinantes.

Palavras-chave: HTLV-1; vacina terapêutica; proteína HBZ; vetor viral MVA.

ABSTRACT

Human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) is a retrovirus that infects about 5 to 10 million people worldwide. Brazil is an endemic country for HTLV-1 and there are about 2,5 million people infected, which represents the region with the highest number of people infected in the world. The virus infects primarily CD4⁺ T cells and it is able to establish a chronic infection that can result in distinct outcomes. The majority of the carriers are asymptomatic, however about 5% of them will develop pathologies related to the infection, such as adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). HTLV-1 express some regulatory proteins, which are crucial in the development of the pathogenesis and chronification of the infection, highlighting the HBZ protein. This protein can promote cell proliferation and host immune response evasion, which result in viral persistence and disease progression. Despite the importance of the HTLV-1, there are not safe and efficient therapies to treat and control the infection. Thus, this work proposes to develop a potential therapeutic candidate to HTLV-1, based on viral vectors. Based on *in silico* analysis and in the literature, HBZ immunogenic epitopes that can induce cellular immune response were identified, these are hypothetically capable of inducing HBZ-specific cytotoxic T cells and lysing the infected cell, in this way, controlling the infection and blocking or reducing the disease progression. Therefore, two gene cassettes coding multiepitope proteins were designed containing the identified epitopes, a signal peptide was added in one of the cassettes. The therapeutic vaccine design was based on the viral vector Modified *Vaccinia virus* Ankara (MVA), a promising vector used in vaccine development. The constructions were successfully generated, the viruses were expanded and confirmed through sequencing.

Keywords: HTLV-1; therapeutic vaccine; HBZ protein; MVA viral vector.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da partícula viral do HTLV.....	15
Figura 2 – Esquema da estrutura genômica do HTLV-1 (provírus).....	17
Figura 3 – Síntese da dupla fita de DNA pela Transcriptase reversa usando RNA como molde.....	19
Figura 4 – Esquema do ciclo de multiplicação viral.....	21
Figura 5 – Diferentes estratégias virais do HTLV-1 de transmissão célula-célula.....	22
Figura 6 – Estimativa da distribuição geográfica da infecção por HTLV-1 no mundo.....	24
Figura 7 – Distribuição geográfica da soroprevalência de HTLV-1/2 no Brasil.....	25
Figura 8 – Desenvolvimento da ATL.....	30
Figura 9 – Mecanismos patológicos do desenvolvimento de HAM/TSP.....	33
Figura 10 – Correlação da carga proviral do HTLV-1 entre sangue periférico (SP) e sistema nervoso central (SNC) no desenvolvimento de HAM/TSP.....	34
Figura 11 – Estrutura do gene HBZ (processado e não processado).....	39
Figura 12 - Ilustração da expressão e interações da proteína e do mRNA HBZ.....	42
Figura 13 - Representação esquemática da partícula viral do Poxvirus.....	51
Figura 14 – Esquema da construção do MVA recombinante por recombinação homóloga.....	52
Figura 15 – Figura esquemática do plasmídeo pLW44.....	63
Figura 16 – Epítomos selecionados indicados no interatoma da proteína HBZ.....	76
Figura 17 – Sequências nucleotídicas e de aminoácidos das sequências codificadora das proteínas multiepítipo.....	77
Figura 18 – Mapa do vetor pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp.....	78
Figura 19 – Gráfico gerado pelo <i>SignalP</i> 4.1.....	79
Figura 20 – Restrição dos plasmídeos pCloneEZ-HBZ-CHI e pCloneEZ-HBZp-CHI pelas enzimas <i>Sma</i> I e <i>Pst</i> I.....	80
Figura 21 – Restrição dos plasmídeos pLW44-HBZ-CHI e pLW44-HBZp-CHI pelas enzimas <i>Sma</i> I e <i>Pst</i> I.....	80
Figura 22 - Alinhamento do sequenciamento do plasmídeo pLW44-HBZ-CHI pelo <i>Multalin</i>	81
Figura 23 - Alinhamento do sequenciamento do plasmídeo pLW44-HBZp-CHI gerado	

pelo <i>Multalin</i>	82
Figura 24 – Microscopia de fluorescência da geração dos MVA recombinantes em células CEF.....	83
Figura 25 – Rodadas de seleções dos vírus recombinantes MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI.....	84
Figura 26 – Padronização da reação de PCR com plasmídeos pLW44-HBZ-CHI em diferentes temperaturas de anelamento.....	85
Figura 27 - Confirmação dos insertos HBZ-CHI e HBZp-CHI no DNA dos vírus MVA recombinantes por PCR.....	86
Figura 28 - Alinhamento do sequenciamento dos vírus recombinantes MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI gerado pelo <i>Multalin</i>	87
Figura 29 – Amplificação dos vírus recombinantes MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI em células BHK-21.....	88
Figura 30 – Confirmação dos transcritos, HBZ-CHI e HBZp-CHI, por RT-PCR.....	89
Figura 31 - Alinhamento do sequenciamento do fragmento de DNA obtido a partir do RNA de células infectadas com os vírus recombinantes MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI gerado pelo <i>Multalin</i>	90
Figura 32 – Teste para detecção das proteínas recombinantes por <i>Western blot</i>	91
Figura 33 – Avaliação dos efeitos citopáticos nas células BHK-21 infectadas com os vírus recombinantes MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI.....	93
Figura 34- Alinhamento das sequências da proteína sHBZ depositadas no GenBank.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades dos iniciadores pLW44.....	64
Tabela 2 - Etapas da amplificação viral e especificações.....	70
Tabela 3 - Propriedades dos iniciadores HBZ-CHI.....	72
Tabela 4 - Epítopos identificados pela ferramenta <i>NetMHCpan 4.0</i>	74
Tabela 5 - Epítopos identificados pela ferramenta <i>NetCTL 1.2</i>	75
Tabela 6 - Epítopos identificados pela ferramenta <i>IEDB – MHC-I Binding Predictions</i>	75
Tabela 7 - Epítopos selecionados para compor a proteína multiepitopo e como foram identificados.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	Domínio ativador
Allo-HSCT	Transplante alogênico com células tronco hematopoiéticas
AP-1	Proteína Ativadora 1 (<i>Activating protein-1</i>)
LVBA	Laboratório de Virologia Básica e Aplicada
ATF	Fatores de ativação de transcrição
ATL	Leucemia/linfoma de células T do adulto
AZT	Zidovudina
bZIP	Zíper básico de leucina
CA	Proteína do capsídeo
CD	Domínio central
CDK	Quinases dependente de ciclinas
CNS	Sistema nervoso central
CREB	<i>cAMP-responsive element</i>
CTL	Células T citotóxicas
DHL	Desidrogenase láctica
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
GFP	Proteína fluorescente verde
GLUT1	Transportador de glicose 1
gRNA	RNA genômico
HAM/TSP	Mielopatia associada à HTLV / paraparesia espástica tropical
HBZ	Fator bZIP do HTLV-1 (<i>basic zipper fator</i>)
sHBZ	Forma processada do HBZ (<i>spliced</i>)
sHBZ-SP1	Forma processada do HBZ (<i>spliced</i> RNA 1)
sHBZ-SP2	Forma processada do HBZ (<i>spliced</i> RNA 2)
usHBZ	Forma não processada do HBZ (<i>unspliced</i>)
HLA	Antígeno leucocitário humano
hnRNP a1	Riboproteína nuclear neural
HSPGs	Proteoglicanas heparan sulfato
hTERT	Telomerase transcriptase reversa humana
HTLV-1	<i>Human T-lymphotropic virus</i> 1 (vírus linfotrópico de células T humanas)
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IN	Integrase
IRES	Sítio de entrada ribossomal interno

LTR	<i>Long terminal repeats</i>
MA	Proteína de matriz
mAbs	Anticorpos monoclonais
M.O.I.	Multiplicidade de infecção
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
mRNA	RNA mensageiro
MVA	Vírus Vaccinia Ankara Modificado
NABP1/OBFC2A	proteína 1 ligadora de ácido nucléico
NC	Proteína do nucleocapsídeo
NRP-1	Neuropilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pDCs	Células dendríticas plasmocitóides
PR	Protease
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PPT	Trato polipurina
RBD	Domínio de ligação ao receptor
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa
SFB	Soro fetal bovino
SP	Sangue periférico
SRE	Elementos de resposta ao soro
SRF	Fator de resposta ao soro
SU	Proteína de superfície
TM	Proteína transmembrana
TR	Transcriptase reversa
TRE	<i>Tax-element response</i>
UFF	Unidades formadoras de foco
VCAM-1	Molécula de adesão vascular-1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	ASPECTOS GERAIS DO VÍRUS	14
1.1.1	<i>Estrutura da partícula e genoma viral</i>	<i>14</i>
1.1.2	<i>Transmissão e multiplicação viral</i>	<i>18</i>
1.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR HTLV	23
1.3	PATOGÊNESE ASSOCIADA AO HTLV-1	25
1.4	LEUCEMIA/LINFOMA DE CÉLULAS T DO ADULTO (ATL)	28
1.5	MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-1/PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL (HAM/TSP)	31
1.6	RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO HTLV-1	35
1.7	A PROTEÍNA HBZ E SUAS FUNÇÕES	38
1.8	TRATAMENTO PARA O HTLV-1 E PATOLOGIAS ASSOCIADAS	44
1.8.1	<i>Tratamento de ATL</i>	<i>44</i>
1.8.2	<i>Tratamento de HAM/TSP</i>	<i>46</i>
1.9	CANDIDATOS VACINAIS CONTRA HTLV-1	47
1.10	VÍRUS RECOMBINANTES COMO AGENTES VACINAIS	49
1.10.1	<i>Plataforma MVA</i>	<i>50</i>
1.10.2	<i>Imunologia da Infecção por MVA Recombinante</i>	<i>53</i>
1.11	APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS/PEPTÍDEO SINAL	54
2	JUSTIFICATIVA	56
3	OBJETIVOS	58
3.1	OBJETIVO GERAL	58
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
4	MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1	ESTRATÉGIA DE TRABALHO	59
4.2	SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS IMUNOGÊNICOS E CONSTRUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS MULTIEPITOPO	59
4.3	GERAÇÃO DE BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES	60
4.4	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	61
4.5	EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDEAL	61
4.6	SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA	62
4.7	SUBCLONAGEM DA SEQUÊNCIA MULTIEPITOPO EM PLASMÍDEOS DE TRANSFERÊNCIA	62
4.8	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DOS PLASMÍDEOS	64
4.9	PRODUÇÃO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS	65
4.9.1	<i>Produção de Células Fibroblásticas de Embriões de Galinha (CEFs)</i>	<i>65</i>
4.9.2	<i>Manutenção de Células</i>	<i>66</i>

4.10	GERAÇÃO DE VÍRUS RECOMBINANTES.....	66
4.11	SELEÇÃO DOS VÍRUS RECOMBINANTES	67
4.12	EXTRAÇÃO DE DNA E DETECÇÃO DOS INSERTOS NOS VÍRUS RECOMBINANTES	68
4.13	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DOS VÍRUS RECOMBINANTES.....	69
4.14	AMPLIFICAÇÃO VIRAL	69
4.15	PURIFICAÇÃO VIRAL.....	70
4.16	TITULAÇÃO VIRAL	70
4.17	EXTRAÇÃO DE RNA, DETECÇÃO E SEQUÊNCIAMENTO DOS TRANSCRITOS NOS VÍRUS RECOMBINANTES	71
4.18	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA CELULARES E DETECÇÃO DA PROTEÍNA MULTIEPITOPO POR <i>WESTERN BLOT</i>	72
5	RESULTADOS.....	74
5.1	PREDIÇÃO DE EPITOPOS E CONTRUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS MULTIEPITOPOS	74
5.2	OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS pCLONEEZ (HBZ-CHI e HBZp-CHI)	79
5.3	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DOS PLASMÍDEOS.....	81
5.4	GERAÇÃO DE VÍRUS RECOMBINANTES E SELEÇÃO DE CLONES	82
5.5	DETECÇÃO DO INSERTO DE INTERESSE NOS VÍRUS RECOMBINANTES	85
5.6	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DOS VÍRUS RECOMBINANTES.....	86
5.7	AMPLIFICAÇÃO E TITULAÇÃO VIRAL	88
5.8	DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS HBZ A PARTIR DE VÍRUS MVA RECOMBINANTES	89
5.8.1	<i>Detecção e sequenciamento de transcritos por RT-PCR</i>	89
5.8.2	<i>Detecção da expressão das proteínas recombinantes por Western blot</i>	90
5.8.3	<i>Análise da morfologia das células infectadas</i>	92
6	DISCUSSÃO.....	94
7	PERSPECTIVAS	100
8	CONCLUSÕES	101
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
	APÊNDICE.....	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS DO VÍRUS

O *Human T-lymphotropic virus* (vírus linfotrópico de células T humanas) (HTLV) é um retrovírus capaz de causar infecção crônica em seres humanos e é também associado com o desenvolvimento de patologias. O HTLV foi o primeiro retrovírus humano descoberto, e foi descrito em 1977 no Japão, e isolado em 1980 por Poiesz e colaboradores (UCHIYAMA et al., 1977; POIESZ et al., 1980). O *Human T-lymphotropic virus* pertence à família *Retroviridae*, da subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus*. Quatro tipos de HTLV já foram descritos, HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4, sendo que os dois últimos foram descritos no ano de 2005 e apresentam prevalência muito baixa (GESSAIN et al., 2013). É estimado que cerca de 5 – 10 milhões de pessoas estejam infectadas em todo mundo pelo HTLV-1, que é altamente endêmico em regiões específicas. A transmissão do vírus pode ocorrer de três modos, sendo elas, transmissão da mãe para filho, relação sexual, e transmissão por sangue contaminado (GESSAIN; CASSAR, 2012). Cerca de 3 a 5% de indivíduos infectados pelo HTLV-1 desenvolverão as doenças associadas ao vírus, sendo principalmente a leucemia de células T do adulto (ATL), e doença neurológica, mielopatia associada ao HTLV / paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), enquanto a maioria dos indivíduos apresentam infecção crônica assintomática (COOK et al., 2013). Em resposta à infecção por HTLV-1, o organismo humano é capaz de gerar uma resposta imunológica, porém não é capaz de eliminar o vírus (OLIÈRE et al., 2011). Diferentes estratégias de tratamento vêm sendo utilizadas em pacientes infectados sintomáticos, porém nenhum destes tratamentos é específico e comprovadamente eficaz no tratamento das patologias causadas pelo HTLV-1 (ROMANELLI; TAKAYANAGUI; COSTA, 2015).

1.1.1 Estrutura da partícula e genoma viral

Os retrovírus são vírus da família *Retroviridae*, e são diferenciados pela presença da proteína transcriptase reversa (RT), que é capaz de sintetizar uma cópia de DNA a partir do RNA genômico viral, e pela integrase, que integra a cópia de DNA ao DNA genômico da célula hospedeira. Diversos retrovírus já foram isolados em diferentes espécies hospedeiras e são classificados em sete gêneros, *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Deltaretrovirus*,

Epsilonretrovirus, *Gammaretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumavirus*. Os retrovírus são reconhecidos também pela capacidade de induzirem tumores, infecção progressiva lenta, e infecção persistente não associada a patologia (COCHRANE, 2011).

Pertencente ao gênero *Deltaretrovirus*, o HTLV é um vírus envelopado de estrutura complexa, com forma esférica a pleomórfica com diâmetro de 80 a 100 nm. O envelope viral é composto por proteínas estruturais, a proteína de superfície (SU) e a proteína transmembrana (TM), também se encontra ligado ao envelope a proteína da matriz (MA). O capsídeo viral é formado por proteínas do capsídeo (CA) e apresenta simetria icosaédrica. O genoma viral é localizado no interior do capsídeo, e é constituído por duas moléculas de RNA idênticas e de fita única com polaridade positiva, que são ligadas covalentemente entre elas por proteínas do nucleocapsídeo (NC). Três enzimas virais também estão presentes no cerne viral, a transcriptase reversa (TR), integrase (IN) e a protease (PR) (COCHRANE, 2011). A estrutura da partícula viral pode ser observada na Figura 1.

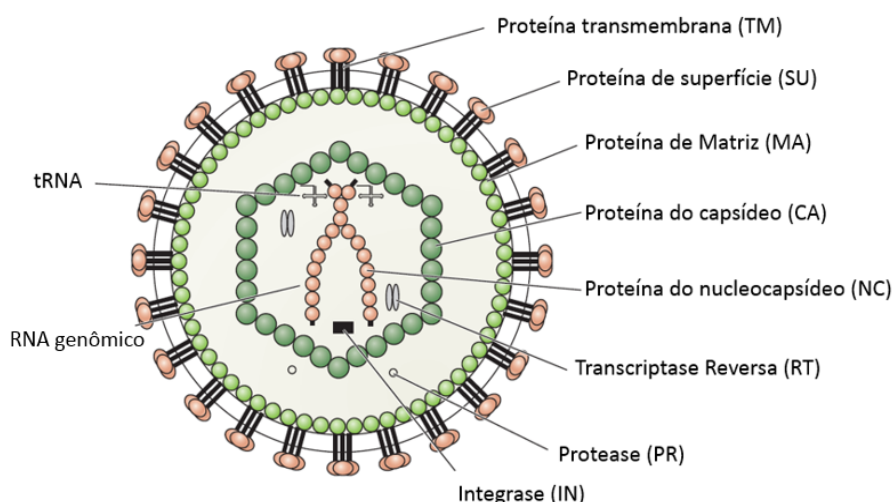


Figura 1 – Representação esquemática da partícula viral do HTLV. Está destacado as proteínas estruturais e não estruturais do HTLV, assim como o genoma viral no interior do capsídeo, que é envolto pelo envelope viral. Fonte: Adaptado de COCHRANE, 2011.

A estrutura genômica do HTLV é composta por três regiões, comum aos retrovírus, sendo elas, *gag*, *pol* e *env*, com a adição da região pX localizada próxima a extremidade 3', sendo que há sobreposição de nucleotídeos entre os genes. O progenoma do HTLV apresenta cerca de 9000 pares de bases, precisamente 9032 pb para o HTLV-1 (SEIKI et al., 1983). A região codificadora é flanqueada por duas regiões não codificadoras nas extremidades, são regiões repetitivas, chamadas de *long terminal repeats* (LTR). A região LTR é dividida em três regiões, U3, R e U5. O gene *gag* é a primeira região codificadora próximo a extremidade 5', este é primeiramente traduzido em uma poliproteína, que é então clivada formando as

proteínas estruturais da matriz, do capsídeo e do nucleocapsídeo. O gene *pro* é localizado entre genes *gag* e *pol*, compartilhando pares de bases, e é responsável pela síntese da enzima protease. A protease é responsável pelo processamento de proteínas, ela é capaz de clivar de forma específica as proteínas Gag e Pol, e a si própria. O gene *pol* codifica enzimas necessárias para a replicação viral, sendo elas a transcriptase reversa e a integrase. A RT é responsável pela síntese de DNA fita dupla a partir do RNA fita única, a enzima apresenta atividade de DNA polimerase e RNase H, já a integrase é responsável pela clivagem do DNA da célula e a ligação do DNA viral ao genoma da célula hospedeira. O gene *env* codifica as proteínas do envelope viral, sendo a proteína de superfície e a proteína transmembrana (GOFF, 2013).

A região pX (ORF I a IV) do progenoma do HTLV-1, localizado próximo a extremidade 3', é responsável pela codificação de proteínas regulatórias e acessórias através de processamentos alternativos. As proteínas regulatórias são chamadas de Tax (ORF IV) e Rex (ORF III) e são essenciais para a replicação viral. A Tax é uma fosfoproteína de 40kDa que interage com a maquinaria de transcrição celular para promover a transcrição e replicação viral, além de desregular o ciclo celular. Rex é uma fosfoproteína de 27 kDa e tem a função de estabilizar e transportar RNA viral para o citoplasma e regular a expressão gênica viral. A região pX também codifica quatro proteínas acessórias, nomeadas como, p12^I, p21^I, p13^{II} e p30^{II}, que também são cruciais no estabelecimento da infecção viral; pois elas são capazes de manter altos títulos virais, induzir a ativação celular e regular a transcrição. O gene pX^I codifica as proteínas p12/p8^I e p21^I, enquanto o gene pX^{II} codifica as proteínas p13^{II} e p30^{II}, através de processamento alternativo. A proteína p12^I tem ação na replicação viral e na ativação de células T, a p13^{II} tem ação na promoção da apoptose, a p30^{II} modula a expressão gênica viral nos níveis transcricional e pós-transcricional. A proteína p30^{II} é ainda essencial para a infectividade do HTLV-1 *in vivo*, esta proteína interfere de maneira específica com o sistema interferon em monócitos e células dendríticas, sendo essencial nos passos iniciais de infecção e persistência viral. A função da p21^I ainda é desconhecida (MICHAEL; NAIR; LAIMORE, 2010; FENIZIA et al, 2014; ARUPAM et al, 2013). A estrutura genômica do HTLV-1 pode ser observada na Figura 2 (provírus).

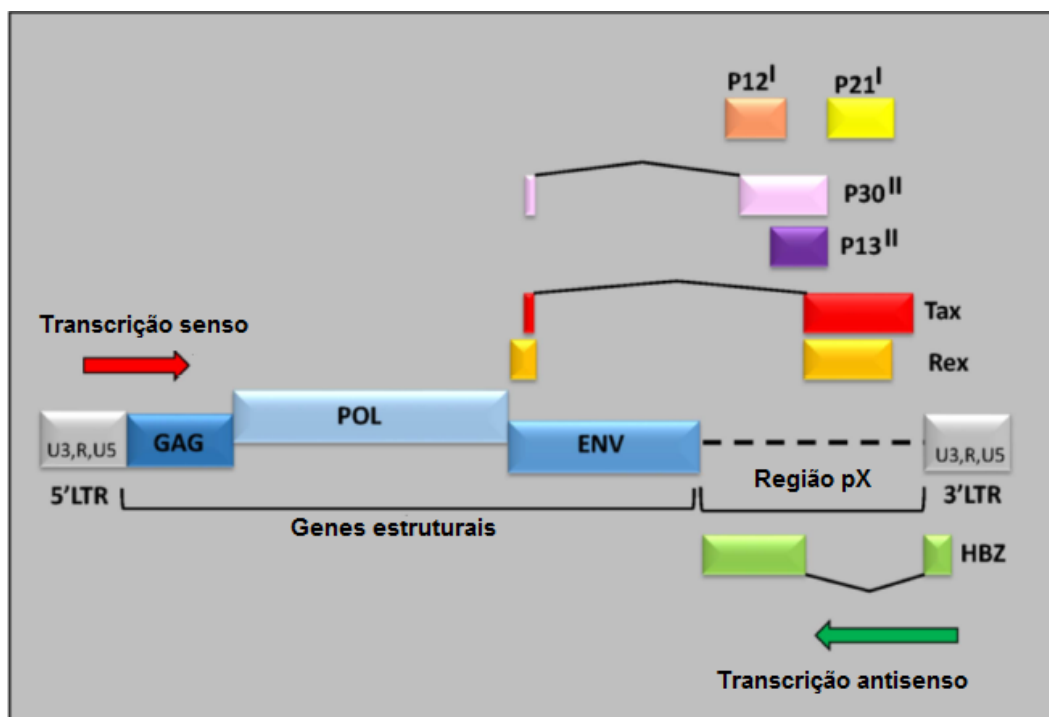


Figura 2 – Esquema da estrutura genômica do HTLV-1 (provírus). O RNA viral é demonstrado no sentido 5' para 3' e possui regiões não codificadoras (U3, R, U5) nas extremidades e codificadoras no interior. São transcritos na fita senso, *gag*, *pol*, *env*, *tax*, *rex*, *p13^{II}*, *p30^{II}*, *p12^I*, *p21^I*. Na fita antisenso, o gene *hbz* é transcrito. Fonte: Adaptado de MERSNARD et al., 2015.

O progenoma do HTLV-1 também codifica um gene em sua fita complementar. O transcrito antisenso *hbz* é traduzido na proteína HBZ (*basic zipper factor*) e é localizado na extremidade 5' da fita de DNA complementar. O gene *hbz* possui duas isoformas de transcrição, uma não processada (*ushbz*; *unspliced*), descoberta em 2002 (GAUDRAY et al, 2002) e o transcrito processado (*shbz*; *spliced*), descrito em 2006 (MURATA et al, 2006). Os dois transcritos se diferem em um pequeno número de bases na região 5' de suas sequências codificadoras. Consequentemente, as proteínas codificadas pelo *ushbz* e *shbz* possuem sequências quase idênticas, exibindo funções similares (MA; YASUNAGA; MATSUOKA, 2016). As duas isoformas apresentam poucas diferenças na estrutura primária e compartilham os mesmos domínios, porém são comumente localizadas em regiões diferentes, sendo a sHBZ distribuída no núcleo e em maior quantidade, enquanto a usHBZ é encontrada na região perinuclear. A proteína HBZ é capaz de interagir com vários fatores de transcrição, como os reguladores do ciclo celular. Ao contrário da proteína Tax, a HBZ reprime a ativação transcricional, induzindo o estado de latência das células infectadas com HTLV-1, o que contribui para a cronificação da infecção (BARBEAU; MESNARD, 2015; MA; YASUNAGA; MATSUOKA, 2016).

1.1.2 Transmissão e multiplicação viral

A transmissão do HTLV pode ocorrer de diferentes modos, sendo eles, via relações sexuais, de mãe para filho ou contato com sangue contaminado. A transmissão sexual ocorre principalmente do homem para mulher, a presença de doenças sexualmente transmissíveis e alto número de parceiros sexuais aumenta a probabilidade de infecção (MURPHY et al., 1989). A transmissão vertical do vírus da mãe soropositiva para o filho ocorre principalmente através da amamentação, sendo que o leite materno pode apresentar linfócitos infectados com HTLV (KUSUHARA et al., 1987). A transmissão intrauterina pode ocorrer, porém em taxas muito baixas (KATAMINE et al., 1994). O uso de drogas injetáveis, com compartilhamento de seringas e agulhas, favorece também a transmissão do HTLV (KHABBAS et al., 1990). Alguns casos de ATL e HAM/TSP documentados após transfusão de sangue e transplante de órgãos já foram relatados, seguido também da soroconversão. Atualmente em vários países já é feita a triagem para a detecção de anticorpos contra o HTLV-1 e HTLV-2 nas doações de sangue (MURPHY, 2016). Em nosso país a obrigatoriedade de testagem do sangue para estes vírus existe desde o ano de 1993.

Seguido da transmissão do vírus, o ciclo de multiplicação viral inicia-se através da adesão e da penetração às células do hospedeiro. A principal célula hospedeira do HTLV-1 é o linfócito T CD4⁺, porém este vírus é também capaz de infectar linfócitos T CD8⁺, células dendríticas, entre outras células. A ligação entre o vírus e a célula T CD4⁺ se dá por dois receptores celulares, o transportador de glicose 1 (GLUT1) e neuropilina-1 (NRP-1). O GLUT-1 forma um complexo com NRP-1 para interagir com o domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína de superfície. Além destes dois receptores a presença de proteoglicanas heparan sulfato (HSPGs) também é necessária para ligação eficiente do virion à célula. As três moléculas celulares formam um complexo iniciando o processo de fusão, que permite a entrada do nucleocapsídeo viral no citoplasma da célula (MATSUOKA; FUJII, 2013; MARTIN et al., 2016).

Após a entrada do vírion, ocorre a síntese de DNA fita dupla pela transcriptase reversa, que reconhece o tRNA^{Pro} ancorado ao genoma viral como iniciador. A síntese do DNA inicia-se na região LTR 5', formando um DNA intermediário de polaridade negativa. O fragmento de DNA é então translocado para a região LTR 3' do RNA, pareando-se e utilizado como iniciador da fita negativa de DNA. Durante a síntese da fita negativa de DNA, o RNA vai sendo degradado pela atividade RNase H da RT. Um fragmento de RNA na região PPT (trato polipurina) é resistente a digestão, permanecendo hibridizado na fita de DNA negativa

recém-sintetizada. O fragmento de RNA é utilizado como iniciador da síntese de um fragmento de DNA positivo intermediário na região LTR 5' da fita negativa. O fragmento de DNA recém-sintetizado é então translocado para a região 3' da fita negativa, promovendo a síntese completa da fita positiva, que se dá através de um intermediário circular. A região extrema de ambas as fitas é então sintetizada, e o DNA fita dupla completa torna-se linear (Figura 3). Durante esse processo, o cerne viral é parcialmente desnudado e translocado em direção ao núcleo. O DNA é então liberado no interior do núcleo, onde é integrado ao DNA cromossômico pela ação da integrase, que ocorre em sítios não específicos. O provírus torna-se permanentemente incorporado no genoma da célula infectada, e é replicado na divisão celular para as células filhas (MARTIN et al., 2016; GOFF, 2013).

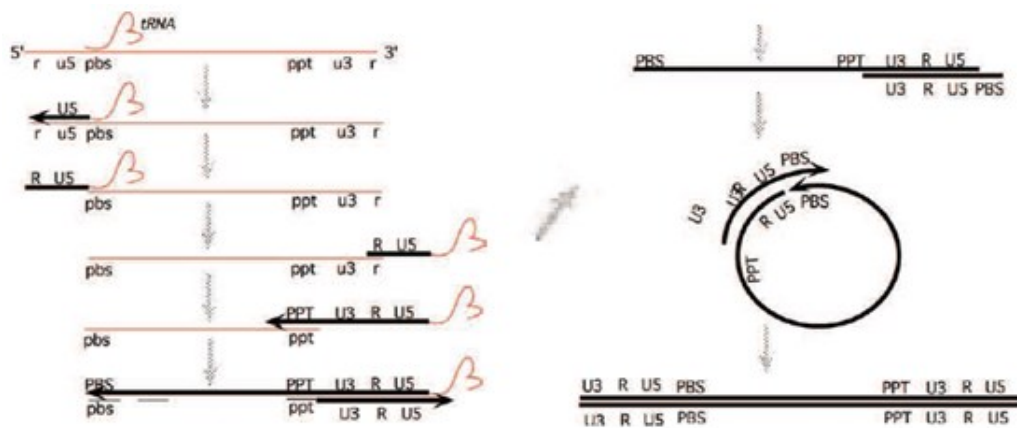


Figura 3 – Síntese da dupla fita de DNA pela Transcriptase reversa usando RNA como molde. As linhas claras representam o RNA e as linhas escuras representam o DNA. Os passos dessa figura estão explicados no texto acima. Fonte: Adaptado de GOFF, 2013.

Com o provírus integrado ao genoma da célula hospedeira, ocorre a iniciação da transcrição de proteínas virais. A região LTR do provírus contém o promotor e elementos iniciadores de transcrição, que são necessários para iniciar a transcrição dos genes virais. A proteína Tax é a principal proteína ativadora da transcrição viral na fase precoce. E esta é capaz de promover o recrutamento de fatores de transcrição celular, através da interação com a região U3 do LTR. Na transcrição ocorre a síntese do transcrito primário, que tardiamente será processado para ser utilizado como mRNA e RNA genômico (gRNA). Após a síntese dos mRNAs no núcleo da célula, estes são direcionados para o citoplasma. A proteína Rex é responsável por regular o transporte do mRNA, através da interação com as porções U3 e R do LTR. A proteína Rex é marcada com um sinal de exportação nuclear, permitindo que esta se transloque entre o núcleo e o citoplasma (MATSUOKA; FUJII, 2013). O processamento dos mRNAs também é regulado pela Rex. A concentração de Rex no núcleo regula os níveis

de transcritos com processamento único, duplos ou sem processamento. Durante a transcrição precoce, a Rex é encontrada em baixas concentrações, que resulta no transporte de transcritos com processamento duplo (transcritos da região pX). Quando há o acúmulo de Rex no núcleo, há a diminuição do processamento dos transcritos com processamento duplo, enquanto os transcritos com processamento único e sem processamento são direcionados para o citoplasma (*env*, *gag-pro-pol*) (HIDAKA et al., 1988).

Com os mRNAs no citoplasma, estes são traduzidos em proteínas virais pela maquinaria de síntese protéica celular, enquanto o RNA genômico pode ser também traduzido ou direcionado para membrana plasmática, onde é dimerizado com proteínas Gag para ser empacotado. Estudos ainda são realizados para esclarecer como é realizado o reconhecimento dos mRNAs virais. Porém, há sugestões tanto para a via dependente de *cap* como para via independente de *cap*, através do sítio de entrada ribossomal interno (IRES). Os mRNAs que foram duplamente processados ou não processados são traduzidos por ribossomos livres, enquanto o mRNA com processamento único, referente a *Env*, é traduzido pelos ribossomos ligados a membrana. O tráfico das proteínas estruturais e do gRNA para a membrana plasmática com a finalidade de iniciar a montagem da partícula viral ainda é pouco conhecido (MARTIN et al., 2016).

Para a montagem da partícula viral, é necessário que haja interações entre as proteínas Gag, o gRNA e a membrana plasmática. As proteínas Gag se agregam na membrana plasmática, lado a lado, formando uma estrutura protéica. Com a expansão da estrutura protéica, inicia-se o brotamento da partícula viral. Neste processo a partícula viral vai sendo montada e então a partícula viral imatura é liberada. Durante a montagem viral, outras proteínas, como as proteínas codificadas por *pol* e *env*, também são incorporadas no complexo viral. Após a liberação da partícula viral imatura, essa ainda necessita ser maturada para ser tornar infectiva. A protease viral é responsável pela clivagem das proteínas Gag e Pol, que se reestruturam a fim de modificar a morfologia viral para gerar a partícula viral madura. A partícula madura é então capaz de infectar células não infectadas. O ciclo de multiplicação está representado pela Figura 4 (MARTIN et al., 2016).

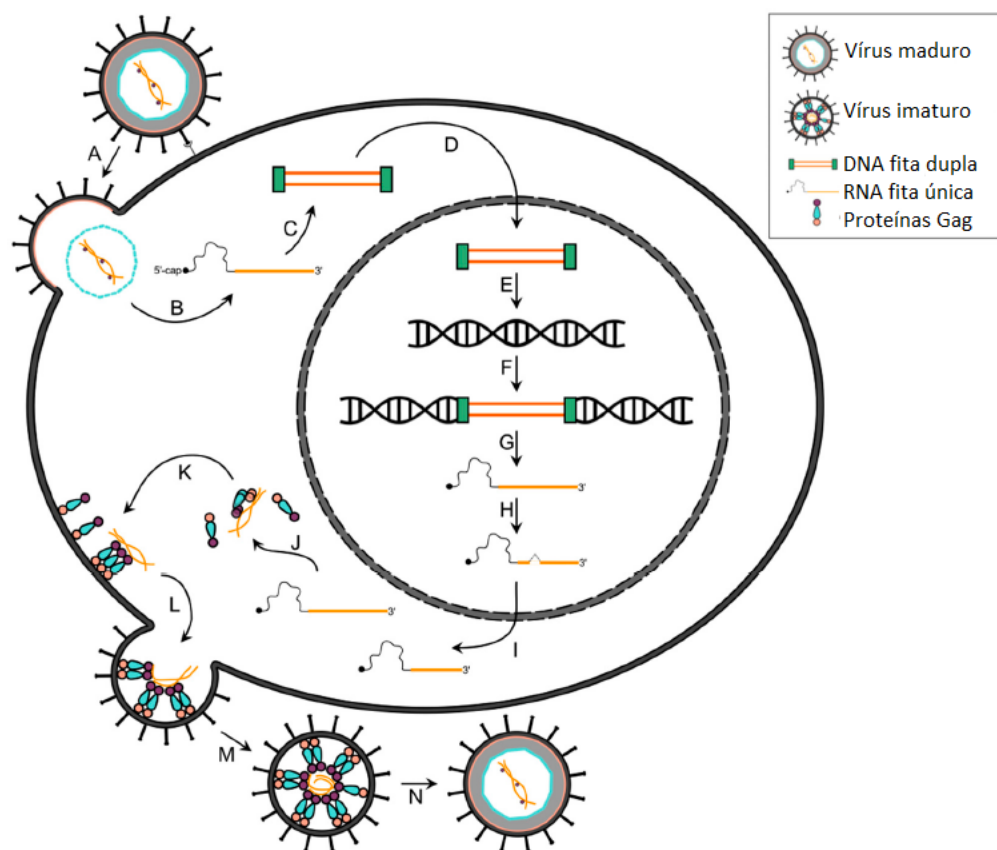


Figura 4 – Esquema do ciclo de multiplicação viral. (A) Adesão e fusão do envelope viral. (B) Desnudamento e liberação do gRNA. (C) Síntese do DNA de fita dupla pela Transcriptase Reversa. (D) Transporte do DNA para o núcleo. (E, F) Integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, estabelecendo-se o provírus. (G) O provírus é transcrito pela RNA polimerase. (H) Processamento do mRNA viral. (I) O mRNA é transportado para o citoplasma, onde será traduzido. (J) Interação entre o gRNA e proteínas Gag. (K) Transporte das proteínas Gag associadas com gRNA para a membrana plasmática. (L) Montagem da partícula viral. (M) Liberação da partícula viral imatura. (N) Processo de maturação e formação da partícula viral madura. Fonte: Adaptado de MARTIN et al., 2016.

Diferentemente de outros retrovírus, que são capazes de infectar as células T CD4⁺ a partir de partículas virais livres, o HTLV é transmitido principalmente a partir de contato célula-célula. Em estudos *in vitro*, a partícula viral, em sua forma livre, apresentou pouca infectividade em células T, sugerindo que a transmissão ocorra por contato célula-célula na infecção por HTLV-1 *in vivo* (JONES et al., 2008). Foi relatado que na maioria dos casos, indivíduos que recebem componentes sanguíneos celulares de doadores infectados tornam-se infectados, enquanto indivíduos que recebem apenas fração plasmática não se tornam infectados pelo HTLV (PIQUE; JONES, 2012). Porém, já foi observado *in vitro* que ao contrário de células T CD4⁺, células dendríticas são potencialmente infectadas por partículas virais livres, as quais são capazes de transferir o vírus para células T CD4⁺ por contato célula-célula (JONES et al., 2008). Nos eventos de trans-infecção, as células dendríticas capturam as partículas livres do HTLV-1, armazenam as mesmas de maneira transiente em compartimentos

acessíveis à superfície e, antes de se infectarem, transferem o vírus para células T não infectadas (PIQUE; JONES, 2012). O estabelecimento da infecção ocorre através da transmissão do vírus de células infectadas para células não infectadas. A transmissão pode ocorrer dos seguintes modos, via sinapse viral, conduítes celulares, biofilmes, trans-infecção por células dendríticas e expansão clonal (Figura 5).

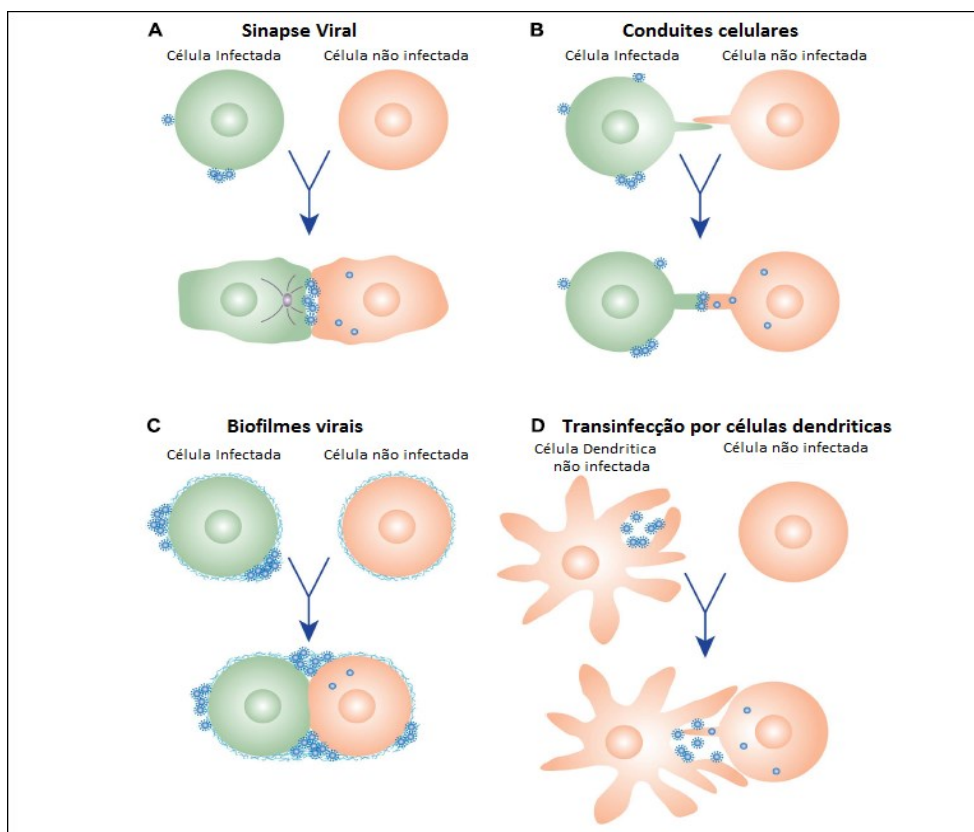


Figura 5 – Diferentes estratégias virais do HTLV-1 de transmissão célula-célula. (A) Sinapse viral (B) Conduítes celulares (C) Biofilmes virais (D) Trans-infecção por células dendríticas Fonte: Adaptado de PIQUE; JONES, 2012.

Na infecção *in vivo*, a transmissão ocorre principalmente entre células T CD4+. Uma das formas de transmissão do HTLV é a sinapse viral. Esta ocorre através da formação de uma área especializada de contato, induzida pelo vírus, que é formada entre o linfócito infectado e o linfócito não infectado, que promove a transmissão do vírus entre as células. A área de contato célula-célula forma uma junção devido a polarização de moléculas de adesão e do centro de organização de microtúbulos, ocorre também a acumulação de proteínas Gag, Env e Tax, e pelo genoma do HTLV. A proteína Tax está envolvida na indução da polarização do citoesqueleto e na formação da sinapse viral, agindo em sinergia com a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1). Durante a sinapse viral não há fusão de membrana, mas a formação de uma fenda sináptica, onde pode ser detectado as proteínas

virais e vírions. Estudos sugerem que os vírions são transferidos da fenda sináptica para a célula não infectada através de endocitose e fusão. A sinapse viral maximiza a efetividade da transmissão, pois esta limita a exposição do vírus à mecanismos de defesa do hospedeiro (NEJMEDDINE; BANGHAM, 2010).

A transmissão do HTLV também pode ocorrer através da formação de conduítes celulares. Estes são estruturas de membrana formados por microfilamentos de actina, que favorecem o contato célula-célula e o transporte de proteínas e vírions. As partículas virais estão presentes na superfície externa do ponto de contato do conduíte. Este se estende formando uma ponte com células não infectadas, possibilitando-se a infecção da célula não infectada. A proteína p8 do HTLV-1 é responsável por mediar a formação dos conduítes e por consequência a transmissão do vírus (PROOYEN et al., 2010).

Além das formas de transmissão que envolvem contato e alteração de membranas, o HTLV-1 pode ser transmitido a partir de um *cluster* de partículas que estão aderidos na superfície das células infectadas. Estas células produzem uma matriz específica, formando um biofilme, onde os vírions estão aderidos. Esta matriz é formada principalmente por colágeno e galectina-3, que formam um ambiente protetor para os vírions. A concentração de partículas virais aumenta a capacidade infectiva das células infectadas por HTLV-1. As células infectadas são capazes de se aderir a células alvo pela matriz extracelular, promovendo a infecção da mesma (PAIS-CORREIA et al., 2010).

Além dos modos de infecção célula-célula, o HTLV se multiplica através da expansão clonal das células infectadas. A expansão clonal ocorre através da divisão mitótica de células contendo o provírus integrado ao cromossomo. A proliferação celular pode ser induzida através da expressão da proteína Tax, promovendo então a divisão em novas células contendo o provírus. Como não há formação de partículas virais na expansão clonal, este modo de multiplicação não é reconhecido pelo sistema imune (CARPENTIER et al., 2015).

1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA INFECÇÃO POR HTLV

É estimado que aproximadamente entre 5 a 10 milhões de pessoas estejam infectadas com HTLV-1 no mundo. A infecção pelo HTLV-1 é endêmica em diferentes áreas do mundo. A distribuição mundial da infecção por HTLV-1 ainda é fracamente estimada, devido a alguns fatores, como por falta de investigação, apenas alguns grupos de pessoas são diagnosticadas (doadores de sangue, grávidas e pacientes hospitalizados), e pela distribuição não homogênea do HTLV-1. O vírus está presente em pequenos grupos de pessoas com uma alta prevalência

de infecção, tendo áreas pouco endêmicas próximas. O diagnóstico do HTLV-1 é realizado por diversas técnicas, como Ensaio Imunoenzimático (ELISA), aglutinação, Western blot e a Reação em Cadeia da polimerase (PCR) (GESSAIN; CASSAR, 2012).

O HTLV-1 não é um vírus ubíquo, e sua prevalência pode mudar drasticamente em determinadas regiões e grupos de pessoas. As áreas mais endêmicas são: o Japão, principalmente o Sudoeste, partes do Caribe, seguido por regiões da América Central e do Sul, áreas intertropicais da África, do Oriente Médio e algumas regiões da Europa (Figura 6). Em todas as áreas endêmicas a soroprevalência aumenta gradualmente com a idade, e ocorre principalmente em mulheres (GESSAIN; CASSAR, 2012).

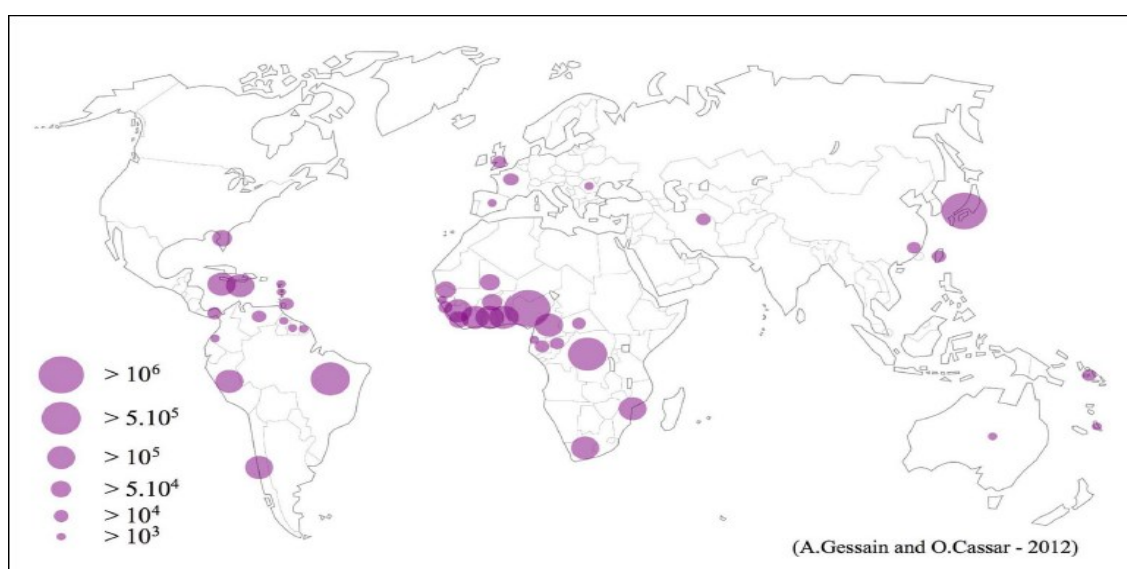


Figura 6 – Estimativa da distribuição geográfica da infecção por HTLV-1 no mundo. Dados obtidos em estudos considerando mulheres grávidas, doadores de sangue e diferentes populações adultas. Fonte: GESSAIN; CASSAR, 2012.

Diferentemente de outros retrovírus, o HTLV-1 não apresenta alta taxa de mutação, por isso, apenas quatro subtipos principais são conhecidos. O subtipo Cosmopolita A, o da África Central B, o Australo-Melanesiano C e o subtipo D da África Central. É consenso que o subtipo A é o mais encontrado em diversas áreas endêmicas (GESSAIN; CASSAR, 2012).

É estimado que o Brasil seja o país com maior número absoluto de pessoas infectadas com HTLV-1/2 no mundo. O Brasil apresenta uma prevalência média de 48/10000 doadores de sangue infectados por HTLV-1/2, aproximadamente 2,5 milhões de pessoas, dado obtido em triagem sorológica no período de 1995 a 2000 (CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005). Existem algumas áreas endêmicas, porém o vírus é encontrado em todo o país. As regiões Norte e Nordeste são as de maior prevalência. Muitos

casos de HAM/TSP, ATL e doenças associadas a infecção são reportados no Brasil. A distribuição geográfica de soroprevalência de doadores de sangue no Brasil pode ser verificada na Figura 7. (PROIETTI, 2015; CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005).

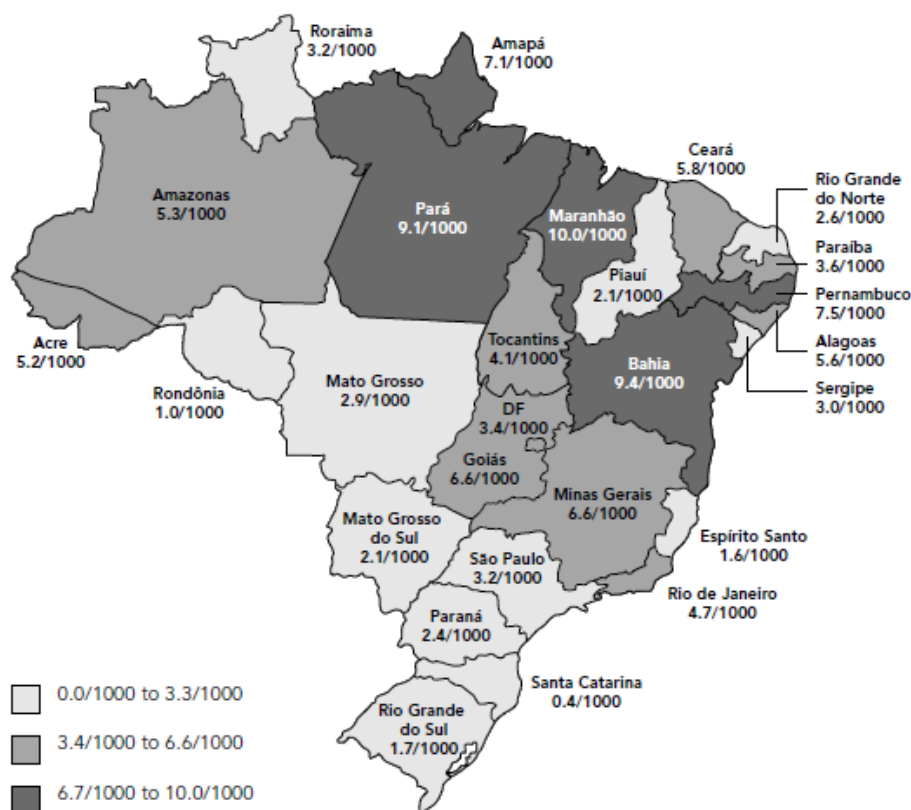


Figura 7 – Distribuição geográfica da soroprevalência de HTLV-1/2 no Brasil. Dados obtidos entre doadores de sangue das capitais brasileiras, baseado em *screening* realizado em ensaio imunoenzimático. Fonte: CATALAN-SOARES; CARNEIRO-PROIETTI; PROIETTI, 2005.

1.3 PATOGÊNESE ASSOCIADA AO HTLV-1

O HTLV foi originalmente isolado através de culturas de linfócitos de um paciente com linfoma da célula T cutânea em 1980, e classificado como um retrovírus e agente etiológico da ATL (POIESZ et al., 1980). Ambos HTLV-1 e HTLV-2 foram reportados por causar doenças neurodegenerativas, porém apenas o HTLV-1 é conhecido por causar doenças linfoproliferativas (MATSUOKA; FUJII, 2013). A correlação entre o HTLV-2 e patologias são mais escassas e quando essa infecção apresenta sinais clínicos, estes são brandos em relação aos quadros clínicos causado pelo HTLV-1, sendo então o HTLV-1 o principal agente etiológico de patologias associadas aos HTLVs. Apesar da ATL e HAM/TSP

serem as principais patologias associadas a infecção de HTLV-1, outras doenças inflamatórias também podem ser observadas, como, uveíte, artrite reumatoide, dermatite infecciosa, polimiosite, alveolite, síndrome de Sjögren, entre outros. A forma com a qual o vírus interage com o hospedeiro, e a relação com diversos outros fatores, como por exemplo o subtipo viral e a genética do hospedeiro, é que determinarão a evolução aos diferentes quadros clínicos associados à infecção (PROIETTI, 2015).

A patogênese causada pelo HTLV-1 está associada à capacidade das proteínas virais regulatórias e auxiliares em desregular a diferenciação, a função e a homeostasia das células T CD4. Porém a resposta imunológica do hospedeiro, principalmente a resposta celular citotóxica das células T CD8, também é um fator determinante do desenvolvimento de doenças. Uma das principais subpopulações de linfócitos T infectadas pelo HTLV-1 são as células T regulatória CD4⁺foxP3⁺ (T_{reg}). Duas características dessas células contribuem para a sobrevivência e multiplicação do HTLV-1, a capacidade imunossupressora e a alta capacidade de proliferação das T_{reg}. Portanto, as células infectadas serão mais resistentes à ação das células T citotóxicas (CTL), promovendo a sobrevivência das células infectadas. A alta capacidade proliferativa resulta numa relevante expansão clonal do provírus (SATOU; MATSUOKA, 2013).

A principal proteína regulatória envolvida na patogênese do HTLV-1 é a proteína Tax. Esta é essencial tanto na replicação viral como na condução de diversos fatores que levam o desenvolvimento de patologias. A proteína Tax é capaz de estimular a expressão de genes virais através da interação com fatores de transcrição e com a região LTR. Tax é uma proteína pleiotrópica que interfere em diversos mecanismos de transcrição celular para ativar a transcrição viral. Como resultado, desregula a expressão de diversos genes celulares, através da interação com ativadores transcripcionais e fatores de transcrição. A transativação de genes induzida por Tax, pode ocorrer através de três vias principais, sendo elas, a CREB/ATF, SRF e NF-κB (BOXUS et al., 2008).

Para que a proteína Tax ative a transcrição, primeiramente, esta interage com *cAMP-responsive element* (CREB) e a fatores de ativação de transcrição (ATF). Como CREB apresenta uma região homologa à LTR, o complexo Tax-CREB/ATF é capaz de se ligar à região promotora do LTR. Após esta interação, Tax recruta coativadores como CBP/p300 para facilitar a iniciação da transcrição. Como a proteína Tax utiliza os fatores CREB/ATF como alvo, ela interfere na regulação de proteínas celulares que são reguladas por estes fatores. As proteínas da família CREB/ATF estão diretamente relacionadas com o crescimento celular, sobrevivência, apoptose e desenvolvimento de câncer. Como

consequência, a Tax ativa genes que codificam IL-17 e c-fos, e também suprime a expressão de ciclina A, p53 e c-myb. Portanto, Tax consegue exercer um papel importante na desregulação do ciclo celular, induzindo a formação de câncer por utilizar CREB/ATF como alvo (BOXUS et al., 2008).

Tax também interage com o fator de resposta ao soro (SRF), ativando a transcrição dos promotores regulados pelos elementos de resposta ao soro (SRE). A interação entre Tax e SRF resulta na ligação do SRF ao SRE, promovendo a transativação do promotor pelos coativadores CBP/p300. Os genes *c-fos* e *c-jun* são oncogenes com transcrição regulada por SRF em resposta a vários estímulos, como, citocinas, fatores de crescimento e sinais de estresse. Contudo, através da interação de Tax e SRF, ocorre a alteração do ciclo celular e consequentemente a transformação celular (BOXUS et al., 2008).

Outro fator de transcrição que é ativado pela Tax é o NF- κ B. Quando as proteínas da via NF- κ B são expressas em condições normais, estas regulam diversos processos biológicos, como crescimento e sobrevivência celulares. A estimulação dessa via é normalmente ativada por estímulos imunológicos, como antígenos e citocinas, de forma transiente. Em células T infectadas expressando Tax, NF- κ B é constitutivamente expressa. Tax é capaz de se associar com diversas proteínas da via NF- κ B, tornando-se capaz de se ligar a promotores alvos. Novamente CBP/p300 são responsáveis por iniciar a transcrição. A alta expressão de IL2 e IL2R α é resultado da interação de NF- κ B e Tax, e são importantes na indução da proliferação celular. Esta interação também está relacionada com o crescimento anormal de células e sobrevivência, promovendo então a transformação das células T (SUN; YAMAOKA, 2005).

Além de interagir com fatores de transcrição da célula hospedeira, a proteína Tax também interage diretamente com proteínas regulatórias do ciclo celular. Consequentemente consegue reprogramar processos celulares, como a regulação do ciclo celular, reparação de DNA e apoptose. A progressão do ciclo celular em uma célula normal é controlada por interações entre ciclinas e quinases dependente de ciclinas (CDK). Entre cada fase do ciclo celular existe um “*checkpoint*”, que são pontos onde proteínas agem garantindo a progressão correta do ciclo celular. Porém, a proteína Tax é capaz de interferir na expressão destas proteínas, e se ligar às mesmas, perturbando a regulação do ciclo celular (MARRIOTT; SEMMES, 2005).

Células infectadas que expressam Tax apresentam uma progressão acelerada da fase G1. Este processo ocorre, pois, Tax liga-se diretamente a ciclinas D3, D2 e CDK4, estabilizando estes complexos. Tax também consegue se ligar a inibidores de CDK, impedindo a ligação destes inibidores. Como resultado, Tax altera a taxa da proteína

Retinoblastoma ligada a E2F, levando a ativação da transcrição dependente de E2F, o que promove progressão acelerada de G1. No “*checkpoint*” entre G1 e S Tax é capaz de inativar a proteína p53, mediadora do “*checkpoint*”, resultando na progressão do ciclo celular sem a verificação de erros no DNA. A interação com p53 inativa também a indução a apoptose por este supressor de tumor, sendo importante na imortalização das células infectadas pelo HTLV-1 (MARRIOTT; SEMMES, 2005).

Durante a fase S a Tax é capaz de reprimir a expressão de ciclina A, bloqueando o mecanismo que garante a duplicação correta do DNA. A aneuploidia observada em células infectadas pode ocorrer nesta fase. Há também a interação de Tax com proteínas do “*checkpoint*” entre G2 e M. Esta é capaz de diretamente se ligar as proteínas Chk1 e Chk2. Dessa forma, Tax impede as proteínas que tem como função detectar erros no DNA e induzir o sistema de reparo de DNA ou suspensão do ciclo celular. Durante a mitose, Tax pode se ligar as MAD1 e APC, proteínas que controlam a citocinese. A interação com APC promove a degradação de ciclina B1, sendo que é necessária em altas concentrações para o início da mitose. Portanto, há um atraso do ciclo celular nesta etapa. A parada da progressão do ciclo celular neste ponto é favorável para a replicação viral, pois a célula está metabolicamente ativa (MARRIOTT; SEMMES, 2005).

A proteína Tax interfere em pontos de regulação do ciclo celular e tem capacidade de interagir com proteínas cruciais que garantem a homeostasia celular. A habilidade da Tax de acelerar a progressão do ciclo celular, bloquear os “*checkpoints*”, inibir reparo de DNA e apoptose, é crítica para a progressão às patologias. Todos estes processos levam a uma desestabilização genômica, acúmulo de mutações e por consequência, a transformação e imortalização celulares. Portanto, a proteína Tax exerce diversas funções que são responsáveis pelo desenvolvimento das patologias causadas pela infecção do HTLV-1.

1.4 LEUCEMIA/LINFOMA DE CÉLULAS T DO ADULTO (ATL)

A Leucemia/Linfoma de célula T do adulto (ATL) é uma doença maligna agressiva dos linfócitos T periféricos. Esta doença é uma neoplasia ligada a células T infectadas pelo HTLV-1. A ATL é desenvolvida em aproximadamente 2.5% dos infectados com HTLV-1 e ocorre frequentemente nas regiões endêmicas. Nos pacientes diagnosticados com ATL, mais de dois terços dos pacientes manifestarão a leucemia, enquanto o restante apresentará o linfoma (MATUTES, 2007). A doença apenas ocorre após um longo período de latência após a infecção, entre 18 e 30 anos. A ATL é causada devida à capacidade oncogênica do HTLV-1,

esta capacidade é resultado das atividades regulatórias das proteínas virais que afetam a expressão de genes celulares cruciais na regulação do ciclo celular e homeostase celular. O acúmulo de alterações genéticas causadas por estes processos leva à proliferação e diferenciação acelerada das células infectadas, e consequentemente à transformação celular e ao desenvolvimento do câncer (OHSHIMA, 2015).

A expressão e atividade da proteína Tax é necessária para transformação celular e início da leucemia, porém apenas 40% das células ATL apresentam transcritos de *tax*. Estas células são capazes de silenciar a expressão de Tax por deleções, mutações e metilações. O silenciamento de Tax ocorre pois esta é o principal alvo de CTL, ou seja, silenciar Tax é uma estratégia do vírus de evadir ao sistema imunológico do hospedeiro. Também é comum encontrar nestas células a deleção ou metilação da região 5' LTR. Contrariamente, a região 3' LTR se mantém intacta em todos os processos do desenvolvimento da ATL, o que sugere a importância da região 3' LTR na manutenção da ATL. O gene HBZ, expresso pela região 3' LTR, também é capaz de suprimir a transativação mediada por Tax, através da heterodimerização com JUN e CREB2. Mas como a supressão de Tax tem um efeito negativo na indução da proliferação celular, o gene *hbz* é capaz também de induzir a proliferação celular ao mesmo tempo que reprime a transcrição de *tax*. (MATSUOKA; JEANG, 2007; SATOU e al. 2006). Satou et al. (2006) demonstraram que transcritos de *hbz* são constitutivamente expressos, pela fita complementar, nestas células. Também foi demonstrado pelo mesmo grupo de pesquisa que a inibição de transcritos *hbz* por “*Small interfering RNA*” (siRNA) reprime a proliferação de células ATL “*in vitro*”. Portanto, a proteína HBZ parece ter uma função crítica na oncogênese causada pelo HTLV-1, mesmo quando Tax não está sendo expressa. A Figura 8 esquematiza, resumidamente, o desenvolvimento de ATL.

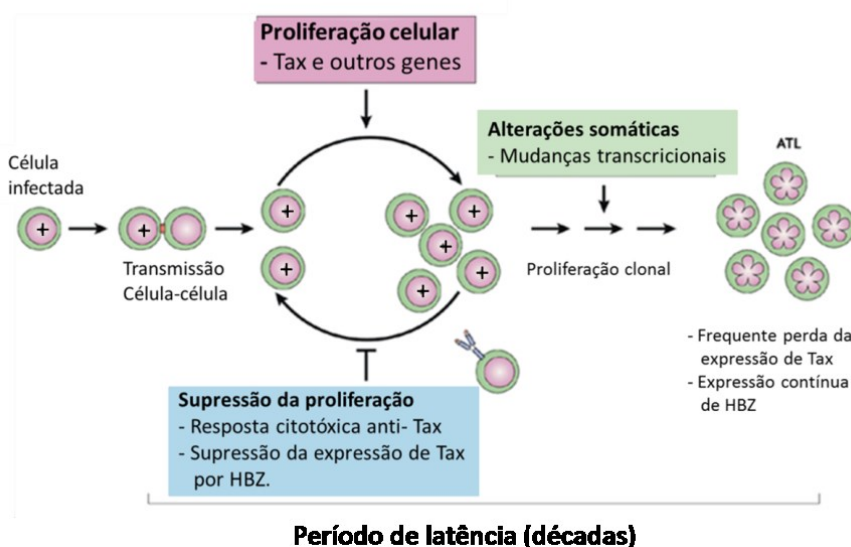


Figura 8 – Desenvolvimento da ATL. O núcleo de células marcadas com “+” representa células com provírus integrados. Células com núcleo em forma de flor representa células ATL. A transmissão do HTLV-1 ocorre via célula-célula. Ocorre a expressão de Tax e subsequentes linfócitos citotóxicos contra Tax são induzidos. A expansão clonal de células infectadas é promovida pela atividade de Tax e outras proteínas virais. Após décadas, emergem células ATL, devido as mudanças transcricionais. A HBZ é constantemente expressa nas células ATL, provendo a proliferação celular, enquanto a expressão de Tax é perdida como forma de evadir das células citotóxicas. Fonte: Adaptado de MATSUOKA; JEANG, 2007.

Após o longo período de latência do vírus, há a fase chamada pré-ATL, onde ocorre a expansão clonal dos linfócitos T infectados pelo HTLV-1 (LOUREIRO; LOPES, 2015). A doença pode se manifestar de diferentes maneiras, quatro evoluções clínicas e prognósticos são reconhecidos: aguda, crônica, indolente e linfomatosa. A forma mais comum da ATL é a aguda, cerca de 65% dos casos. A ATL aguda é caracterizada pela apresentação de sintomas sistêmicos, organomegalia, principalmente a linfadenopatia, hipercalcemia, elevação de Desidrogenase láctica (DHL). O subtipo agudo também caracterizado pela presença de células com formatos atípicos. Lesões na pele também podem ser observadas nestes casos. Pacientes com o subtipo crônico é caracterizado por linfocitose que pode ser estável por longos períodos, com presença de linfócitos atípicos, manifestações na pele, e pode haver um aumento moderado de DHL. Pacientes com a forma indolente de ATL são geralmente assintomáticos, ou podem apresentar rash cutâneo e infiltrado pulmonar, diferentemente dos modos agudos e crônico, não há linfocitose, e menos de 3% das células são atípicas. Porém pode haver a evolução clínica para a forma aguda da forma crônica ou indolente. O subtipo linfoma da ATL é caracterizada pela linfadenopatia sem envolvimento de sangue periférico (MATUTES, 2007).

Os determinantes para a progressão da ATL ainda não estão claramente elucidados. Tanto determinantes virais, como diferentes subtipos virais, carga proviral, níveis de

anticorpos, quanto determinantes genéticos e do ambiente, como polimorfismo de haplótipos HLA, como modo de transmissão, dose do inóculo viral e idade da infecção contribuem para as diferentes consequências da infecção por HTLV-1 (LOUREIRO; LOPES, 2015). O prognóstico da ATL ainda é precário, e a média de sobrevida dos pacientes com os subtipos agudo e linfoma é de menos de um ano. Enquanto a sobrevida estipulada para quatro anos é de apenas 5% para esses dois subtipos clínicos. Para os subgrupos com evolução clínica mais brandas, crônica e indolente, a sobrevida estipulada para quatro anos é de 26,9% e 62% respectivamente (MATUTES, 2007).

1.5 MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-1/PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL (HAM/TSP)

Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP) é outra doença de grande impacto causada pela infecção pelo HTLV-1. HAM/TSP é uma doença neurodegenerativa crônica de origem inflamatória. Aproximadamente 0,3% a 3,8% dos pacientes infectados por HTLV-1 desenvolverão HAM/TSP. Esta é caracterizada pela inflamação da medula espinhal com sintomas de paralização progressiva. Um importante aspecto do desenvolvimento de HAM/TSP é a alta carga proviral, porém apenas a carga viral elevada não é capaz de causar HAM/TSP. Ao contrário da carga viral, uma característica exclusiva dos pacientes com HAM/TSP é a resposta imune aumentada para HTLV-1 (YAMANO, 2015). Linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e macrófagos são encontrados na inflamação, assim como citocinas inflamatórias, como, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ . As principais células efetoras da patogênese da HAM/TSP são os Linfócitos T CD8⁺ citotóxicos (CTL) contra HTLV-1. Estes são capazes de gerar lesões no sistema nervoso central (CNS). A HAM/TSP é caracterizada pela destruição da mielina e perda axonal (OSAME, 2002).

A infecção do CNS se dá a partir da entrada de linfócitos T CD4⁺ infectados com HTLV-1. Moléculas de adesão de leucócitos tem um importante papel na patogênese de doenças inflamatórias. Em HAM/TSP, as lesões da medula espinhal apresentam uma maior expressão de molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) no endotélio. A indução da expressão dessas proteínas está relacionada com a adesão e quimiotaxia de linfócitos T e macrófagos para o CNS. Após a migração transendotelial, células T e macrófagos encontram a matriz extracelular, essa matriz é rompida através da atividade de metaloproteinases de matriz. Este processo é crítico para lesionar a barreira hemato-encefálica (OSAME, 2002). O estudo de Cavois et al. (2000),

evidenciou que o HTLV-1 consegue atravessar a barreira hemato-encefálica pela migração de linfócitos clonais infectados *in vivo*, através da observação dos mesmos sítios de integração do provírus em linfócitos encontrados tanto no sangue como no fluido cerebrospinal de indivíduos infectados.

Pacientes com HAM/TSP apresentam várias disfunções imunológicas não observadas em pacientes assintomáticos, como: a proliferação espontânea de linfócitos T CD4⁺ infectados, o aumento na capacidade de migração de leucócitos circulantes, aumento na porcentagem de células T infectadas ativadas, aumento na expressão de genes virais e de citocinas inflamatórias, como a citocinas neurotóxicas IFN- γ e TNF- α , e a produção de altos títulos de anticorpos específicos contra HTLV-1. A expansão clonal das células T CD4⁺ e o aumento da expressão de antígenos virais resultam na ativação de células T CD8⁺ específicas contra o HTLV-1. A presença das células CD8⁺ e HTLV-1 no CNS desencadeiam a produção de citocinas e quimiocinas que lesionam o CNS (FUZZI et al., 2014).

A patogênese da HAM/TSP está relacionada com três diferentes mecanismos, o da citotoxicidade direta, do dano circundante e da autoimunidade. A citotoxicidade direta é baseada na hipótese que as células do CNS, como o astrócitos, apresentariam também os antígenos virais, assim seriam alvo direto dos linfócitos citotóxicos (SZYMOCHA et al., 2000). O segundo mecanismo é baseado no dano causado a células do CNS frente a produção de citocinas pró-inflamatórias por CTL contra células T CD4⁺ infectadas. Os danos nas células do CNS também podem ocorrer devido a autoimunidade. A proteína imunodominante do HTLV-1 é a Tax, que é o alvo dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos nos pacientes com HAM/TSP. Estes pacientes apresentam alto títulos de anticorpos específicos para Tax, principalmente IgG. Diferentemente da ATL, pacientes com HAM/TSP apresentam alta expressão de *tax*. A autoimunidade na HAM/TSP ocorre devido à semelhança molecular entre Tax e a riboproteína nuclear neuronal (hnRNP A1). A semelhança molecular leva à reação cruzada entre anticorpos específicos para Tax e o autoantígeno hnRNP A1. Portanto, os anticorpos são capazes de reagir com os neurônios, desencadeando uma resposta imune que leva à morte da célula neuronal (LEVIN et al. 2002). Dois destes mecanismos podem ser observados na Figura 9. Estes três mecanismos podem estar ocorrendo de maneira simultânea e causando lesões ao CNS. A proteína Tax também pode estar presente de forma extracelular no fluido cerebrospinal, desencadeando a resposta imune.

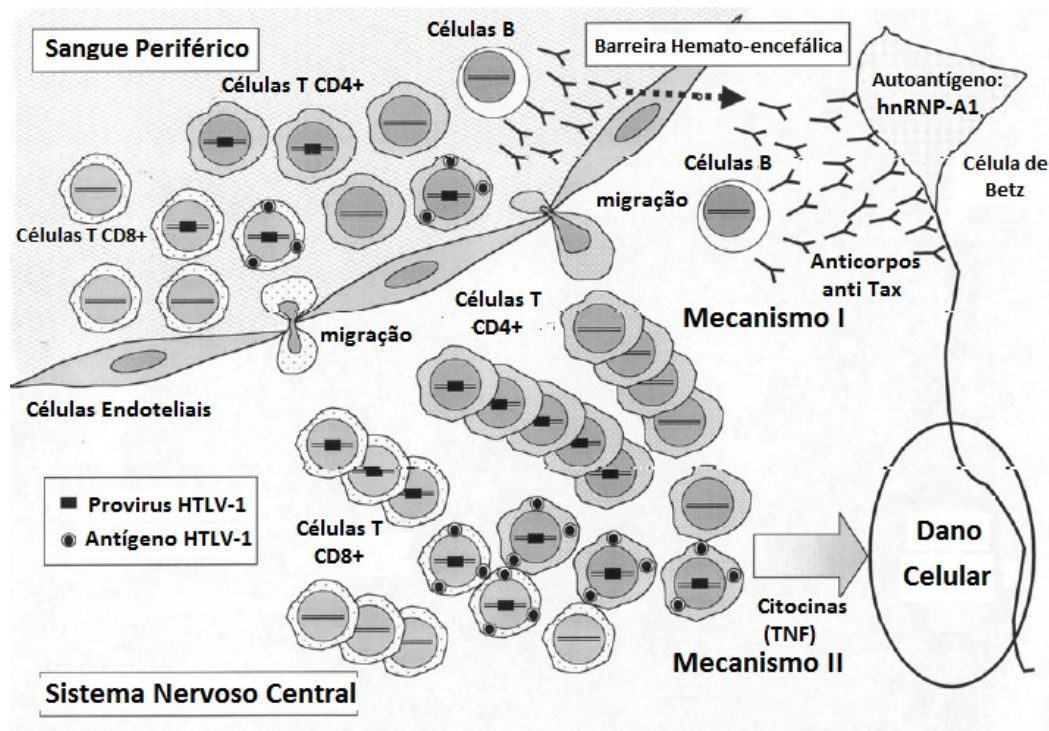


Figura 9 – Mecanismos patológicos do desenvolvimento de HAM/TSP. Mecanismos I: Autoimunidade, anticorpos específicos para Tax reconhecem o autoantígeno hnRNP-A1 induzindo o dano celular. Mecanismo II: Citotoxicidade causada pelas células citotóxicas que interagem com células CD4+ liberando citocinas neurotóxicas que causam dano celular. Fonte: Adaptado de OSAME, 2002.

A proteína HBZ, objeto do presente trabalho, é também muito importante no contexto da HAM/TSP. A expressão do mRNA de HBZ é detectada em maiores níveis em PBMC de pacientes apresentando HAM/TSP do que em portadores assintomáticos (embora ainda em níveis significativamente mais baixos que o visto em pacientes com ATL). Os níveis de mRNA de HBZ em HAM/TSP é correlacionado com as concentrações de neopterina, que é um marcador imunológico que monitora o avanço de HAM/TSP. Portanto, altos níveis de mRNA de HBZ pode estar relacionado com a progressão da doença (SAITO et al., 2009).

A carga proviral não está diretamente relacionada com aspectos clínicos da HAM/TSP, porém pode indicar a sua progressão. Diferentemente de portadores saudáveis, pacientes com HAM/TSP apresentam uma alta carga proviral no fluido cerebrospinal em relação ao sangue. No início da infecção, há um pico na carga proviral, mas é seguida por um declínio e um longo período de latência. Se o paciente apresentar uma resposta imune desequilibrada, a carga proviral tende a aumentar e desenvolver a HAM/TSP, até encontrar um novo equilíbrio (Figura 10) (GRANT et al., 2002).

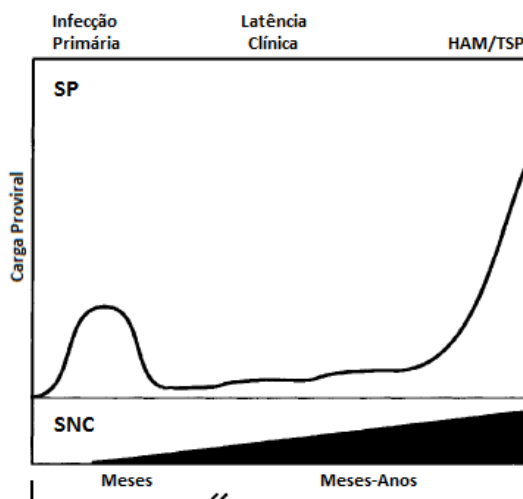


Figura 10 – Correlação da carga proviral do HTLV-1 entre sangue periférico (SP) e sistema nervoso central (SNC) no desenvolvimento de HAM/TSP. Enquanto no SP, a carga proviral apresenta picos e certa estabilidade por tempo, no SNC a carga proviral apresenta crescimento progressivo. Fonte: Adaptado de GRANT et al., 2002.

Além da carga proviral, outros fatores de risco são a genética do hospedeiro e o genótipo viral. A carga proviral está associada a fatores genéticos como o antígeno leucocitário humano (HLA). Os genes do HLA de classe I, HLA-A*02 e Cw*08 estão associados com uma significativa redução da carga proviral e no desenvolvimento de HAM/TSP. Enquanto os HLA de classe I HLA-B*5401 e o de classe II HLA-DRB1*0101 é predisposto em pacientes com HAM/TSP. Como o HLA de classe I é responsável pela apresentação de antígenos para os linfócitos citotóxicos, os alelos HLA-A*02 e Cw*08 são capazes de gerar uma resposta citotóxica contra o HTLV-1. A variação do genótipo viral também está associada a patogênese. Variação no gene *tax* também é um fator de risco para o desenvolvimento de HAM/TSP, ou seja, existem subgrupos de HTLV-1 que são mais capazes de contribuir para esta patologia (SAITO, 2010).

As lesões características da HAM/TSP ocorrem na medula espinhal, predominando na porção torácica. É observada a degeneração do trato corticoespinhal lateral, do trato espinocerebelar e do trato espinotalâmico da coluna lateral. As lesões estão associadas a infiltração perivascular e paranquimal de linfócitos, macrófagos espumosos, proliferação de astrocitos e gliose fibrilar. A destruição da mielina e perda axonal são características histológicas das lesões inflamatórias. A região mais afetada é a medula espinhal, porém lesões mais brandas no cérebro podem ser observadas (OSAME, 2002). A principal manifestação clínica é a paraparesia espástica, que é caracterizada por uma evolução lenta e progressiva envolvendo neurônios motores, que causa déficit sensorial e distúrbios do esfíncter. Um dos

primeiros sintomas característico da HAM/TSP é a fraqueza muscular dos membros inferiores seguido do aumento do tônus muscular (espasticidade). A incapacidade neurológica normalmente ocorre nos primeiros anos da doença. Com o avanço da doença, é normalmente observado disfunções na bexiga, levando à incontinência urinária e retenção. Também pode ser relatado constipação, dores lombares, parestesia dos membros inferiores, a síndrome de Sjögren e disfunção erétil em homens. Com a evolução clínica da doença, é estimado que cerca de 50% dos pacientes necessitarão do uso de cadeira de rodas em 10 anos (FUZZI et al., 2014; GESSAIN; MAHIEUX, 2012).

1.6 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO HTLV-1

A resposta imunológica frente a infecção ao HTLV-1 é muito complexa, dependendo da condição do paciente esta pode ser protetora ou lesiva. Como a infecção por HTLV-1 é crônica, a resposta adaptativa torna-se mais relevante que a resposta inata. Por este motivo, a resposta adaptativa vindo sendo a mais estudada, principalmente a resposta celular. Apesar disso, o HTLV-1 é detectado por componentes do sistema imune inato. Diversos estudos são realizados com o intuito de entender como o sistema imunológico é capaz de controlar a infecção por HTLV-1.

Componentes do sistema imune inato são capazes de reconhecer moléculas conservadas entre vírus, como, ácidos nucleicos virais e glicoproteínas. Os vírus são reconhecidos por células que expressam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Os PRRs são capazes de induzir a expressão de citocinas inflamatórias e interferon do tipo I em resposta a infecção viral. O HTLV-1 pode ser identificado nas diversas etapas do ciclo de replicação por diversos componentes do sistema imune inato. Em células dendríticas plasmocitóides (pDCs) infectadas com HTLV-1, foi demonstrado uma resposta baseada em IFN- α dependente de TLR7, um receptor do tipo Toll. Esta interação resultou na estimulação da maturação das células dendríticas em células citotóxicas efectoras. Porém, um melhor entendimento é necessário para elucidar se a ativação de PRRs pelo HTLV-1 é uma resposta protetora ou apenas uma maneira do vírus facilitar sua replicação e disseminação (OLIERE et al., 2011; COLISSON et al., 2010).

Outra célula do sistema imune inato que também interage com o HTLV-1 é a célula NK. Existe uma relação do nível de mRNA viral e expressão de proteínas virais em células infectadas e a sensibilidade destas pela lise mediada por células NK. Estas são capazes de prevenir a indução da formação ou o desenvolvimento de tumor. Porém mais estudos

precisam ser realizados para definir se este mecanismo de defesa é realmente eficiente na infecção por HTLV-1. Já foi mostrado também que as células T CD4⁺ não são sensíveis a lise mediada pela célula NK, pela regulação negativa de MHC de classe I pela ação da proteína acessória p12^I. Foi mostrado também que pacientes com HAM/TSP apresentam uma menor frequência e menor atividade de células NK do que pacientes assintomáticos (OLIÈRE et al., 2011; JOURNO; MAHIEUX, 2011; BANGHAM; OSAME, 2005).

Pouco ainda se conhece sobre o papel dos neutrófilos na infecção por HTLV-1. Porém, Guerreiro et al. (2005) mostrou que existe uma maior porcentagem de neutrófilos efetores em indivíduos infectados por HTLV-1 do que em soronegativos. Esta diferença pode ser explicada pela alta expressão de IFN- γ observada em soropositivos, pois estas são capazes de ativar neutrófilos. Além disso, os neutrófilos também podem ser infectados pelo vírus.

Diferentemente da resposta imune inata, há uma estimulação expressiva das células do sistema imune adaptativo. O HTLV-1 induz tanto a ativação de células responsáveis pela resposta imune celular como a humoral. A resposta celular citotóxica é a mais estudada no controle da infecção, pois ela está envolvida tanto na resposta protetora como na patogênese.

A resposta celular T CD4⁺ (*helper*) frente a infecção ao HTLV-1 é muito difícil de ser estudada precisamente. Como esta célula é o principal reservatório do vírus, ela é constantemente estimulada pelas proteínas virais. A proteína Tax ativa tanto a transcrição de IFN- γ , como a proliferação dos linfócitos T, sendo que estes são as metodologias mais utilizadas para quantificar as respostas antígeno específico das células T CD4⁺ (BANGHAM; OSAME, 2005). No entanto, foi demonstrado por detecção de produção de citocinas induzidas por antígenos em um curto período, antes mesmo da expressão de Tax (GOON et al., 2002). Foi também observado que pacientes com HAM/TSP apresentam maior frequência de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ específicas para HTLV-1 que carreadores assintomáticos (GOON et al., 2003).

A maioria dos indivíduos infectados com HTLV-1 apresenta uma robusta resposta citotóxica contra o vírus. A maioria dos CTL específicos para HTLV-1 são cronicamente ativados e reconhecem antígenos da proteína Tax. É sugerido que a ação dos CTL é muito importante na redução da carga proviral, protegendo contra o risco de doenças inflamatórias. A vigilância efetiva das CTL anti-HTLV-1 é capaz de reprimir a frequência de células expressando Tax. A eficiência das CTL pode ser medida a partir de dois parâmetros: a taxa de proliferação de CTL em resposta a uma dada concentração de antígeno e a taxa que essas CTL específicos lisam as células alvo (BANGHAM, 2000).

A persistência da infecção por HTLV-1 está relacionada com expressão de Tax e a atividade das CTL. As células CD4⁺ infectadas com HTLV-1 expressam a proteína Tax, que então direciona a mitose das células mantendo a carga proviral. Porém essas células que expressam Tax são o alvo dos CTL específicos, que destroem essas células antes mesmo de completar a replicação viral. Como forma de evasão do vírus, algumas células CD4⁺ infectadas expressam variantes da proteína Tax, que então não são mais reconhecidas pelas CTL. Apesar destas células variantes conseguirem sobreviver ao ataque das CTL, estas não são capazes de superar em número de células, as células que expressam a Tax “selvagem”. As proteínas Tax que apresentam essas mutações também apresentam atividade reduzida, havendo então, uma incapacidade da proteína Tax de transativar as vias celulares responsáveis pela proliferação celular. Portanto, cria-se um equilíbrio entre os vírus, que persistem em replicar e as células citotóxicas que os contra-atacam (BANGHAM; OSAME, 2005).

A proliferação e ativação das CTL é dirigida pela carga viral, que provê o estímulo antigênico. Uma alta carga viral promove então uma alta atividade citotóxica. Porém, o aumento da atividade dos CTL faz com que as células infectadas sejam mortas e por consequência, há a diminuição da carga viral, resultando na diminuição do estímulo antigênico e por consequência, diminuição da ativação de CTL específicos. Consequentemente, é gerada um equilíbrio entre a carga proviral e a atividade de CTL. A variação da taxa lítica dos linfócitos CD8⁺ é o fator determinante na variação na carga proviral e consequentemente no rumo da infecção por HTLV-1 (BANGHAM; OSAME, 2005). Porém, se a resposta citotóxica não for efetiva, o estímulo antigênico continuará presente e consequentemente, haverá o aumento da expressão de Tax que irá induzir a expressão de citocinas, como o IFN- γ . Portanto, uma resposta citotóxica efetora é capaz de gerar proteção, enquanto uma resposta citotóxica não efetora pode contribuir para a inflamação, como nos pacientes com HAM/TSP. A efetividade do CTL pode estar ligada com a presença de HLA específicos, como o HLA-A*02 e HLA-Cw*08 (BANGHAM, 2000).

Tanto os pacientes assintomáticos quanto os pacientes com doenças associadas ao HTLV-1 apresentam títulos de anticorpo anti-HTVL-1. Logo após a infecção por HTLV-1, os primeiros anticorpos detectados são anti-Gag, e são predominantes nos dois primeiros meses, após este período, anticorpos contra proteínas do envelope são induzidos. Em relação a proteína Tax, cerca de 50% de indivíduos infectados apresentam anticorpos anti-Tax em concentrações detectáveis. O título de anticorpos anti-HTLV-1 está relacionado com a carga proviral, e podem atingir alto níveis (BANGHAM, 2000).

Akimoto et al. (2007) observaram uma relação entre a resposta humoral e celular. Foi observado uma correlação positiva entre a frequência de anticorpos anti-Tax e de CTL anti-Tax. Esta relação pode ser explicada pelo fato de que a ativação policlonal de células B pode ajudar na resposta citotóxica de memória das CTL. Embora os anticorpos anti-Tax não sejam capazes de destruir as células infectadas diretamente, estes podem ajudar a reduzir a carga proviral indiretamente. Porém, a falta de um bom modelo animal dificulta o estabelecimento entre anticorpos anti-HTLV-1 e a proteção contra a infecção por HTLV-1 ou o desenvolvimento de doenças associadas a infecção (BANGHAM, 2000).

A proteína HBZ também apresenta antigenicidade, porém de menor relevância quando comparada com Gag, Env e Tax. Enose-Akahata et al. (2013) observaram que tanto pacientes assintomáticos quanto pacientes com ATL ou HAM/TSP apresentavam anticorpos contra Gag, Env e Tax em uma frequência superior a 90%, sendo que apenas 11,8% apresentavam anticorpos anti-HBZ. Não foi observada correlação entre a resposta humoral anti-HBZ e a carga proviral ou mesmo a expressão de mRNA de HBZ. Shiohama et al. (2016) também verificaram anticorpos anti-HBZ em plasma de indivíduos japoneses infectados com diferentes quadros clínicos. Os dados obtidos foram: 10,4% em pacientes assintomáticos, 10,8% em pacientes com HAM/TSP e 16,7% em paciente com ATL, sem diferença estatística significativa entre os três grupos. Já neste último estudo, houve correlação entre indivíduos anti-HBZ positivos e a expressão de mRNA de HBZ no grupo de pacientes assintomáticos, a mesma correlação não foi relatada em pacientes com ATL ou HAM/TSP. Quanto à carga proviral e anticorpos anti-HBZ, também não houve correlação em nenhum dos grupos. Enose-Akahata et al. (2013) propõem que estes anticorpos podem interagir com células infectadas com HTLV-1 e que também podem inibir a proliferação de linfócitos de pacientes com HAM/TSP. Foi verificado também que a presença de anticorpos anti-HBZ está relacionada com uma menor ativação celular de linfócitos T CD8⁺ (ENOSE-AKHATA et al. 2013).

1.7 A PROTEÍNA HBZ E SUAS FUNÇÕES

A proteína HBZ (*basic zipper factor*) é uma proteína acessória do HTLV-1 que é transcrita na fita antisenso do provírus, a partir do promotor 3' LTR. Três isoformas transcricionais de HBZ foram descritas: a forma não-processada (usHBZ) e duas formas alternativas processadas (sHBZ-SP1 e sHBZ-SP2) (BARATELLA et al., 2017; CAVANAGH et al., 2006; MURATA et al., 2006). Quanto às duas isoformas de HBZ processadas, ambas são encontradas em células infectadas pelo HTLV-1, porém, a variante sHBZ-SP2 ocorre em

menor frequência que a sHBZ-SP1. Os estudos iniciais das variantes argumentam fortemente que a sHBZ-SP1 é a responsável por produzir a proteína HBZ e que a variante sHBZ-SP2 bem como usHBZ podem ser fontes importantes da expressão de HBZ em outros contextos ainda não estudados (CAVANAGH et al., 2006). Ambas isoformas (processada e não processada) apresentam sequências codificadoras quase idênticas, a diferença está nos primeiros aminoácidos da região 5'. A isoforma processada (sHBZ) inicia-se com os aminoácidos $_1\text{MAAS}_4$ enquanto a forma não processada (usHBZ) inicia-se com $_1\text{MVNFVSA}_7$ (Figura 11). Estudos mostram que ambas exercem a mesma função, porém a isoforma processada é mais abundante e, por consequência, a mais estudada (MA; YASUNAGA; MATSUOKA, 2016), tendo sido observado um nível de expressão da forma processada em quantidades quatro vezes maiores em relação à forma não processada em células ATL (Usui et al., 2008). Foi também demonstrado que a meia vida da proteína usHBZ é muito mais curta que a da sHBZ-SP1 (YOSHIDA et al., 2008).

A HBZ é uma proteína nuclear de aproximadamente 25 kDa e apresenta três diferentes domínios (ENOSE-AKHATA et al. 2013). A partir da região N-terminal tem o domínio ativador (AD), um domínio central (CD) e o domínio zíper de leucina básica (bZIP). Cada domínio da proteína HBZ é capaz de interagir com várias proteínas celulares, e consequentemente desencadear diversas respostas celulares (MA; YASUNAGA; MATSUOKA, 2016).

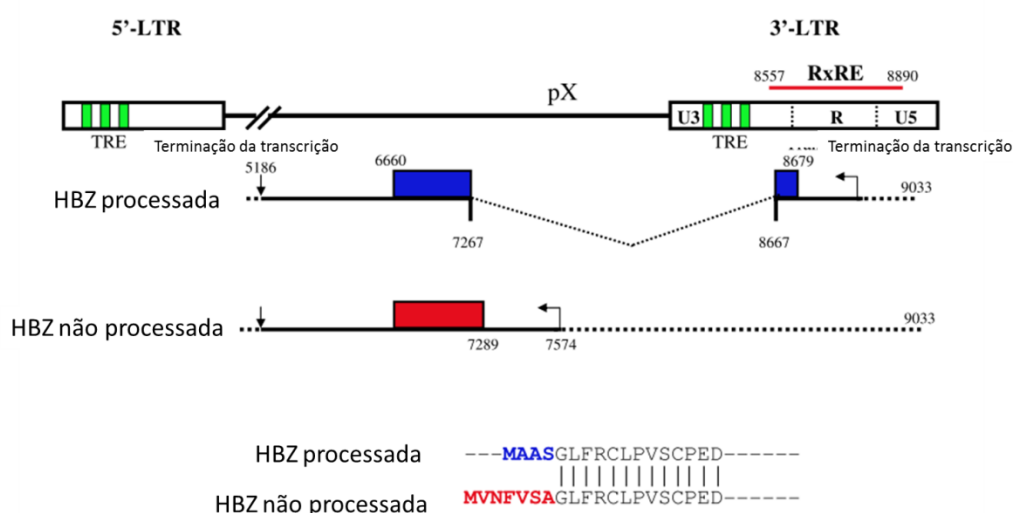


Figura 11 – Estrutura do gene HBZ (processado e não processado). O promotor do gene HBZ está localizado na região U5 e R do 3'LTR. A expressão do gene ocorre na fita complementar do provírus. O primeiro éxon do HBZ processado corresponde a região que codifica a proteína o elemento responsivo a Rex. A diferença entre as duas proteínas pelo processamento dos genes, está baseado em 4 aminoácidos do gene HBZ processado e sete aminoácidos no HBZ não processado. Fonte: Adaptado de MATSUOKA; GREEN 2009.

A expressão de ambas isoformas de HBZ é induzida por promotores ausente de TATA. A isoforma processada possui diversos sítios de iniciação transcricional no U5 e R na região 3'LTR, enquanto a isoforma não processada se inicia dentro de gene *tax*. A transcrição de HBZ é dependente de SP1, fator de transcrição de promotores ausentes de TATA. A transcrição de HBZ também pode ser induzida pelo complexo Tax, CREB e p300/CBP através do *tax-response elemento* (TRE) presente na região U3 (Figura 12) (YOSHIDA et al. 2008).

O gene *hbz* é constantemente expressado nas células infectadas por HTLV-1, e a abundância de mRNA de HBZ está positivamente correlacionado com a carga proviral em pessoas infectadas.. Estudo desenvolvido na coorte GIPH-Fundação HEMOMINAS com 37 indivíduos assintomáticos e 26 indivíduos com HAM/TSP instalada, analisou a carga proviral e foi considerada alta carga proviral mais de 1% de células infectadas pelo HTLV-1 no indivíduo e baixa carga proviral menos de 1% de células infectadas. Observou-se que tanto em HAM/TSP quanto em assintomáticos, havia indivíduos com alta e baixa cargas, portanto, somente este marcador biológico não funcionaria com um preditor do risco do desenvolvimento de HAM/TSP. Assim, e considerando que na coorte GIPH a média de idade dos indivíduos que desenvolvem HAM/TSP é de 45,8 anos, separou-se os indivíduos assintomáticos com alta carga proviral em “jovens” (≤ 51 anos, variação de 19 a 51 anos) e “velhos” (≥ 55 anos, variação de 55 a 65 anos). De maneira surpreendente foi verificado que somente no grupo de assintomáticos com alta carga proviral e considerados “jovens”, a expressão de mensageiros de sHBZ e Tax, normalizada pela carga proviral, era consistentemente alta para os dois transcritos testados. Assim, concluiu-se que a expressão aumentada de transcritos de sHBZ e Tax em pacientes assintomáticos que apresentam uma carga proviral alta indica um maior risco de desenvolver HAM/TSP (ANDRADE et al., 2013).

A proteína HBZ é responsável por exercer diversas funções na infecção por HTLV-1. Uma destas funções é a capacidade de reprimir a transativação induzida pela Tax, que ocorre através da interação com diferentes moléculas que estão relacionadas com a transativação, como p300/CBP, CREB e da via clássica de NF- κ B. No domínio AD da proteína HBZ, há dois motivos de sequência LXXLL que são os mediadores da interação entre a HBZ e os fatores de transcrição p300/CBP. A interação ocorre no domínio KIX da proteína CBP, que é o mesmo domínio de ligação da Tax. A interação entre HBZ e p300/CBP resulta na repressão da transcrição viral induzida por Tax, que é importante na evasão do vírus frente as células do sistema imunológico (CLERC et al., 2008). A proteína HBZ também é capaz de se ligar

diretamente a CREB através do domínio bZIP, que é um dos primeiros mecanismos envolvido na transcrição viral mediada por Tax. Esta interação resulta na inibição da ligação entre CREB e a sequência CRE do promotor viral e consequentemente inibe a ativação da transcrição induzida por Tax (LEMASSON et al., 2007) (Figura 12). Ma et al. (2013) demonstrou que a interação de HBZ e CREB também regula negativamente a expressão de ciclina D1, importante proteína regulatória do ciclo celular.

Além disso, a proteína HBZ é capaz de regular negativamente a via clássica de NF- κ B, através de interações com os domínios AD e bZIP. A proteína HBZ é capaz de interagir com a proteína p65, uma proteína pertencente a via clássica de NF- κ B. Essa interação resulta na inibição da capacidade da proteína p65 em ligar-se a DNA e na sua degradação. Desta forma, a proteína HBZ regula negativamente a via clássica de NF- κ B, que tem como resultado a diminuição da expressão de genes associados à imunidade inata e respostas inflamatórias por essa via (ZHAO et al., 2009) (Figura 12). Ma et al. (2017) demonstraram que a interação de HBZ com p65 também reprime a ativação do promotor de ciclina D1. A ativação da via NF- κ B pela Tax induz senescência celular, porém parte dessa indução é inibida pela atividade da proteína HBZ. Então, a regulação simultânea da via NF- κ B pela Tax e HBZ é favorável para a proliferação de células infectadas e oncogênese (ZHI et al., 2011).

O transcrito e a proteína HBZ interagem e regulam também outras moléculas relacionadas com a proliferação celular, como o gene *E2F1* e proteínas da família Jun. O RNA de HBZ é capaz de induzir o aumento da expressão do gene *E2F1*, que é um regulador da progressão do ciclo celular. A expressão aumentada de *E2F1* está ligada à oncogênese (SATO et al., 2006). O domínio bZIP também interage com proteínas da família Jun, como JunB, c-Jun e JunD, e por consequência, modula a atividade transcricional dessas proteínas. A interação entre HBZ, JunB e c-Jun, diminui a atividade dessas proteínas de ligação ao DNA, diminuindo a transcrição viral e de promotores celulares via atenuação de AP-1 (*Activating protein-1*). A interação com JunD estimula a atividade transcricional deste, resultando na ativação de genes celulares, como a telomerase transcriptase reversa humana (hTERT). A ativação de hTERT é crítica para a progressão do tumor tardiamente (Figura 12) (MATSUOKA; GREEN, 2009).

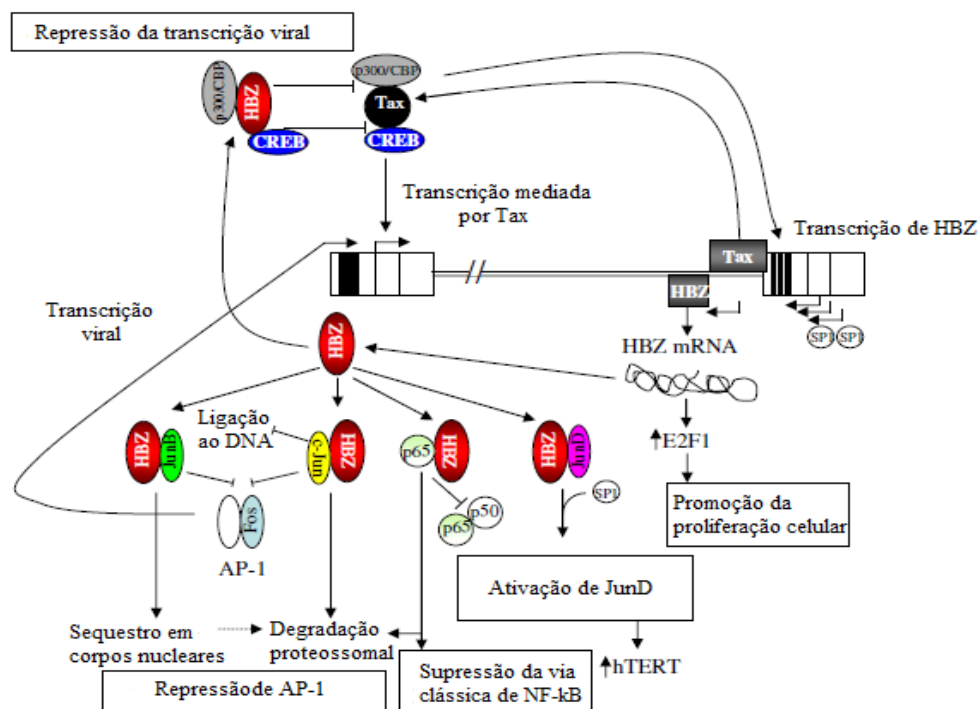


Figura 12 - Ilustração da expressão e interações da proteína e do mRNA HBZ. A transcrição viral a nível basal é ativada por AP-1 (dímeros Jun/Fos), que favorece a expressão de Tax. A proteína Tax interage com CREB, p300/CBP e TRE (promotor) para a transativação da transcrição viral. A transcrição de HBZ é iniciada na região 3'LTR, esta é ativada por SP1 e Tax. A proteína HBZ interage diretamente com CREB e p300/CBP reprimindo a transativação de Tax. A proteína HBZ também interage com as proteínas da família Jun. A ligação a JunB e c-Jun promove a degradação proteossomal destas, que resultam na inibição da interação das proteínas Jun com Fos, reprimindo a transcrição mediada por AP-1. A proteína HBZ também interage com JunD, induzindo a transcrição do gene da transcriptase telomerase reversa humana (hTERT). HBZ também interage com a proteína p65, inibindo a ativação da via clássica de NF-κB. O mRNA de HBZ induz a expressão de E2F1, que promove a proliferação celular. Fonte: Adaptado de MATSUOKA; GREEN, 2009.

A infecção por HTLV-1 pode levar a diferentes desfechos, e estes são dependentes da expressão relativa das proteínas Tax, Rex e HBZ. Quando a expressão de Tax e Rex é robusta, proteínas estruturais são abundantemente produzidas. Nesta mesma condição, a via NF-κB está sendo ativada por Tax, o que induz a senescência celular. Porém, a senescência pode ser revertida pela maior expressão de HBZ em relação a Tax e Rex. Isso ocorre, pois nesta condição a proteína HBZ é capaz de moderar a ativação de NF-κB por Tax, evitando a senescência celular e permitindo a proliferação de células infectadas. Além disso, proteína HBZ é capaz de induzir a persistência da infecção por HTLV-1 através da sua relação com a proteína Rex. A proteína HBZ bloqueia a exportação dos transcritos de proteínas estruturais virais mediada por Rex. O impedimento da tradução dessas proteínas impossibilita a biosíntese da partícula viral, dificultando o reconhecimento das células infectadas pelo sistema imune, induzindo a latência viral (PHILIP et al., 2014).

Outro mecanismo pelo qual a HBZ é capaz de garantir a sobrevivência celular é pela repressão da apoptose. A proteína HBZ inibe a apoptose tanto pela via intrínseca quanto pela

via extrínseca, utilizando como alvo a FoxO3a. O domínio central (CD) é capaz de se ligar a FoxO3a, impedindo a interação desta com o DNA. Deste modo, a FoxO3a é impedida de induzir a expressão dos genes *bim* e *fasL*, que são genes supressores de tumor. As proteínas Bim e FasL medeiam as duas principais vias de apoptose, a intrínseca e a extrínseca, respectivamente. Portanto, HBZ reprime a indução da apoptose pela regulação negativa de genes proapoptóticos. Além disso, em células ATL, já foram verificadas modificações epigenéticas no promotor do gene *bim*, que também leva à supressão da expressão de Bim (TANAKA-NAKANISHI et al., 2014). A HBZ também está envolvida na inibição da autofagia; HBZ interage com a proteína GADD34, que é responsável por ativar a via de sinalização de mTOR e induzir autofagia. A interação entre HBZ e GADD34 resulta na repressão da indução da autofagia por esse mecanismo (MUKAI; OSHSIMA, 2013).

Assim como a proteína Tax, a proteína HBZ também é capaz de perturbar a integridade genômica. Células de pacientes com HAM/TSP e ATL expressam altos níveis de miRNAs oncogênicos. A expressão destes miRNA, como o miR17 e miR21, está relacionada com a expressão de HBZ. Estes miRNAs interagem com NABP1/OBFC2A (proteína 1 ligadora de ácido nucléico), regulando-a negativamente, resultando na perturbação da estabilidade genômica, além de induzir uma proliferação anormal. Ademais, a proteína HBZ é capaz de induzir quebras das fitas de DNA, contribuindo para anormalidades citogenéticas e mutações somáticas, que são características das células ATL (VERNIN et al., 2014).

Em experimentos *in vivo*, com a utilização de camundongos transgênicos capazes de expressar HBZ pelas células T CD4⁺, verificou-se a contribuição da proteína HBZ para a proliferação celular e para a resposta inflamatória. Foi observado que a proteína HBZ é capaz de induzir a expressão de Foxp3, fator de transcrição importante na proliferação de células T. Foi verificado também que a frequência de células T Foxp3 positivas nestes camundongos era similar à frequência em células de pacientes com ATL, e que a função de Foxp3 também estava comprometida, assim como em células ATL, indicando então que a HBZ é responsável pela característica fenotípica das células ATL. Foi observado nestes camundongos linfomas de células T e doenças inflamatórias sistêmicas (SATOU et al., 2011). Utilizando o mesmo modelo animal, verificou-se que apesar da proteína HBZ não ser altamente imunogênica, a inflamação é observada nestes animais devido a propriedades intrínsecas das células que expressam HBZ. Foi observado que a expressão de Foxp3 não é estável com o tempo, porém após a perda da expressão de Foxp3, estas células se tornaram produtoras de IFN- γ . Neste caso, os camundongos apresentaram inflamação no intestino, nos pulmões e na pele (YAMAMOTO-TAGUCHI et al., 2013). Estudo recente, conduzido em camundongos

transgênicos (C57BL-6) expressando GranzimaB-HBZ, demonstrou o papel de HBZ na indução de perda óssea e linfoproliferação. Os resultados mostraram que dois terços dos animais transgênicos desenvolveram doença linfoproliferativa a partir do 18º mês, incluindo tumores de pálpebras, aumento de baço e contagem anormal de células brancas do sangue. Tumores estavam presentes primariamente em tecidos linfóides e mesentéricos, com um número significativo de células hematopoiéticas CD45+. Concomitantemente aos tumores, os animais desenvolveram perda óssea significativa e hipercalcemia e células HBZ positivas foram detectadas nos tumores, no baço e na medula óssea (ESSER et al., 2017).

Estudos genômicos do HTLV-2 demonstraram também a codificação de uma proteína na fita antisenso do provírus do HTLV-2. Essa proteína é chamada de APH-2 (*antisense protein of HTLV-2*). Diferentemente da HBZ, a APH-2 não possui o domínio bZIP, porém é capaz de interagir com proteínas celulares e reprimir a transativação mediada por Tax2. A APH-2 pode estar relacionada com o desenvolvimento de doenças relacionadas a infecção por HTLV-2, por mais que estas sejam menos relatadas (HALIN et al., 2009).

A proteína HBZ contribui para a infecção e patogênese do HTLV-1 de diversas maneiras. Pelas suas características de induzir a proliferação celular, evadir do sistema imunológico, reprimir apoptose e autofagia, induzir respostas inflamatórias e instabilidade genômica, e ser expressa continuamente faz da proteína HBZ um alvo terapêutico.

1.8 TRATAMENTO PARA O HTLV-1 E PATOLOGIAS ASSOCIADAS

1.8.1 Tratamento de ATL

O tratamento da infecção por HTLV-1 é dependente da doença associada ao vírus e ao quadro clínico. Os pacientes com ATL são tratados baseado nos subtipos clínicos da doença. As estratégias de, espera vigilante com o monitoramento da progressão da doença ou de tratamento com IFN- α e zidovudina (AZT) é utilizado no subtipo indolente, enquanto estratégias como, quimioterapia e transplante é utilizada nas formas mais agressivas da ATL. As lesões na pele que podem ser observadas na ATL, podem ter um tratamento paralelo, com o uso de esteroides tópicos e fototerapia. A combinação de IFN- α e AZT mostrou ser eficiente no controle da infecção, porém o efeito terapêutico destas drogas não é diretamente citotóxico às células leucêmicas, a combinação desses medicamentos resulta na inibição da telomerase, reprogramando as células a senescência mediado por p53, além da inibição da replicação

viral. Um estudo de meta-análise de 254 pacientes com ATL realizado por Bazarbachi et al. (2010), reportou que pacientes apresentando os tipos, agudo, crônico e indolente de ATL tiveram melhores resultados com a terapia antiviral (AZT e IFN- α), porém pacientes com linfoma obtiveram melhores resultados com a quimioterapia (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina e prednisona - CHOP). Foi relatado também que a terapia antiviral apresentou 100% de sobrevida por 5 anos em pacientes com o subtipo crônico e indolente. Porém de todos pacientes analisados, apenas 46% apresentaram sobrevida de 5 anos. Mesmo que o tratamento com IFN- α e AZT seja mais indicado no subtipo indolente, este tratamento confere melhor prognóstico para as formas mais agressivas de ATL, como tratamento inicial seguido de quimioterapia, do que apenas a quimioterapia (KATO; AKASHI, 2015; TSUKASAKI; TOBINAI, 2013). Apesar dos resultados positivos desta terapia como primeira linha, esta terapia é capaz apenas de suprimir a ATL, mas não de erradicá-la a longo prazo.

Desde de 1978, os casos mais severos de ATL vem sendo tratados com quimioterapia, alguns ensaios clínicos vêm sendo mais utilizados, como o CHOP e LSG15/VCAP-AMP-VECP (vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina e prednisona), sendo que o LSG15 substituiu o VCAP-AMP-VECP com uma administração intratecal com metotrexano e prednisona. A taxa de remissão completa com a terapia LSG15 é de 40% comparada com os 25% observado em CHOP, sendo que a taxa de sobrevida em três anos foi de 24% para LSG15 e de 13% para CHOP. Inúmeras terapias vêm sendo desenvolvidas nas últimas décadas para a ATL com a combinação de quimioterápicos. Apesar da melhoria observada da remissão completa ou parcial, a taxa de sobrevida ainda é muito baixa e ainda não existe um padrão-ouro de quimioterapia (KATO; AKASHI, 2015; LOUREIRO; LOPES, 2015).

Na última década o tratamento Allo-HSCT (Transplante alogênico com células tronco hematopoiéticas) se tornou um importante tratamento curativo em pacientes com as formas agressivas de ATL. Os pacientes podem receber o transplante de doadores com HLA compatíveis, mas o transplante com medula óssea não compatível e de sangue de cordão umbilical vem sendo utilizado com alternativa. Em 2015 no Japão, mais de 1500 pacientes com ATL receberam Allo-HSCT, a taxa de sobrevida em três anos destes pacientes foi de 41% com transplantes compatíveis, 39% com transplantes de medula óssea não compatível e apenas de 17% com transplantes de com cordão umbilical. A introdução de anticorpos monoclonais vem sendo realizada, estes são capazes de marcar as células ATL e desencadear uma resposta citotóxica específica, apesar deste tratamento não ser muito eficaz sozinho, ele pode contribuir na sobrevivência de pacientes transplantados. Apesar do transplante ser uma

das melhores alternativas para ATL mais grave, a taxa de mortalidade relacionado ao procedimento ainda é muito alta, cerca de 46,1% (KATO; AKASHI, 2015).

Mesmo com os diferentes tratamentos para ATL, o prognóstico destes pacientes ainda é muito pobre, sendo que a sobrevida média para as formas mais graves de ATL é de 5% e dos subtipos indolente e crônico é de 62% e 26,9%, respectivamente. Diante dessa situação, novas terapias devem ser desenvolvidas para aumentar a expectativa de vida destes pacientes (MATUTES, 2007).

1.8.2 Tratamento de HAM/TSP

O prognóstico da HAM/TSP é a evolução progressiva da doença sem remissão, após muitos anos as complicações secundárias podem resultar em morte. Segundo Olindo et al. (2006), foi reportado em estudo de 14 anos que o tempo médio para o paciente com HAM/TSP necessite de apoio unilateral é de 6 anos, para apoio bilateral o tempo é de 13 anos. Para restrição a cama e cadeira de rodas o tempo médio é de 21 anos. As terapias apresentadas para a HAM/TSP ainda não são eficazes no tratamento para combater a inflamação crônica. Os pacientes fazem uso de terapias para os sintomas. Atualmente, as abordagens terapêuticas são baseadas em terapias imunomodulatórias e antivirais. A direção das abordagens terapêuticas para a HAM/TSP envolve a repressão da ativação imune, inibição da migração de células infectadas para a medula espinhal e redução da inflamação crônica. Muitos estudos foram realizados utilizando terapia corticosteroide, danazol, vitamina C, interferon α , zidovudina e lamivudina, porém todos com sucesso clínico limitado, com benefícios de curta duração. Como há uma relação entre carga proviral e desenvolvimento de HAM/TSP, diminuir a carga proviral em pacientes assintomáticos pode evitar o desenvolvimento da doença. (YAMASAKI et al., 1997; TAYLOR et al., 2006; CRODA et al., 2008; NAKAMURA, 2009).

De fato, dado que o HTLV-1 induz um quadro desmielinizante e progressivo, nenhum dos poucos esquemas terapêuticos propostos até o momento foram capazes de prevenir os agravos da cronificação da infecção/desenvolvimento e instalação da HAM/TSP. A terapia antirretroviral contra essa patologia tem mostrado de pouco ou nenhum efeito, sendo este tratamento sintomático e empírico (BALESTRIERI et al., 2008; ALBERTI et al., 2011). O uso de drogas anti-espásticas, analgésicos, laxativos e drogas para o controle da bexiga ajudam a reabilitação de pacientes com HAM/TSP (ARAUJO; SILVA, 2006). Glicocorticóides reduzem a desabilidade motora, devido às propriedades anti-inflamatórias, e

o uso de corticóides pode reduzir a espasticidade dos pacientes (ALBERTI et al., 2011). O uso de antispasmodicos e ácido ascórbico apresentou uma melhora nos sintomas dos pacientes de 50% e 20%, respectivamente (MOENS et al, 2012).

Devido à falta de um tratamento específico, o tratamento sintomático é utilizado para controlar o comprometimento neurológico nestes pacientes. Uma série de drogas podem ser utilizados para minimizar os diferentes sintomas reportados. É relevante reportar o tratamento fisioterapêutico contínuo, que é relacionado à melhorias no equilíbrio, marcha e redução de dor nos pacientes com HAM/TSP. Apesar destes tratamentos não curar a HAM/TSP, estes são capazes de proporcionar uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes (BRITTO; CORREA; VINCENT, 2014).

Em se tratando da HAM/TSP, já é comprovado que ambas as proteínas, Tax e HBZ possuem um papel marcante na desregulação imune, embora não se saiba até o presente momento como estas proteínas são efetivamente reguladas e como cooperam nos diferentes mecanismos de disparo nas células infectadas. Terapias que controlem a expressão de produtos gênicos específicos do HTLV-1 poderão ser mais efetivos em prevenir o desenvolvimento da mielopatia. Regulação ou indução de respostas imunes específicas ao HTLV-1 poderiam melhorar o prognóstico dos pacientes com HAM/TSP, abrindo a perspectiva de novos estudos para a identificação e testagem de novos produtos, capazes de induzir o disparo de resposta imune anti-HTLV-1 específica (ENOSE-AKAHATA et al., 2017)

1.9 CANDIDATOS VACINAIS CONTRA HTLV-1

Devido ao impacto das doenças associadas ao HTLV-1, muitos estudos foram também direcionados a desenvolver uma vacina. Vacinas recombinantes utilizando adenovírus, vaccínia e proteínas do envelope viral foram geradas, porém quando utilizadas na imunização de animais, estas apenas apresentaram proteção parcial em números limitados de animais após o desafio (MAHIEUX, 2015). Nakamura et al (1987) estudaram o potencial da imunização de proteínas Env recombinantes expressas em *Escherichia coli* em macacos. Após o desafio com células MT-2 (células originadas de leucócitos de paciente com ATL), foi verificado a imunização eficiente de 2 grupos de macacos, porém, 1 grupo apresentou infecção por HTLV-1. Portanto, a proteína Env recombinante não foi eficiente em gerar resposta protetora em todos os animais imunizados. Vacinas baseadas em vetores virais expressando Env também foram testadas, tanto em adenovírus quanto em vaccínia. Em ratos imunizados com

adenovírus, apenas 3 de 13 ratos não apresentaram soroconversão, para antígenos da proteína viral Gag, após o desafio, ou seja, não houve a indução da produção de anticorpos neutralizantes (KAZANJI et al., 1997). Coelho imunizados com vaccínia expressando Env apresentaram proteção após primeiro desafio, porém após subsequente desafio houve a soroconversão dos animais para antígenos do HTLV-1 (FRANCHINI et al., 1995). Nestes estudos utilizando a proteína Env como alvo, foi apenas observado proteção parcial contra o HTLV-1. Também não foi observado resposta protetora a partir de vacinas baseadas em peptídeos da proteína Env (FRANGIONE-BEEBE et al., 2000).

Kazanji et al. (2006) desenvolveram um candidato a vacina baseada em uma quimera de peptídeos derivados de Tax. Neste estudo, macacos foram imunizados com peptídeos e foi relatado alto títulos de anticorpos, alta frequência de células expressando IFN- γ específicos e redução da carga proviral, porém apenas proteção parcial foi observada. Além disso, vacinas baseadas em Tax podem induzir efeitos não desejados, como a transformação celular (OHASHI et al., 2000). Apesar da imunogenicidade de Tax, esta pode deixar de ser expressa em células ATL, o que dificultaria a utilização de Tax como alvo para terapias (TAKEDA et al., 2004).

Fujii et al. (2016) desenvolveram um candidato a vacina profilática, através da imunização passiva. Foram desenvolvidos anticorpos monoclonais (mAbs) neutralizantes anti-HTLV-1 gp46 (glicoproteína) capazes de bloquear a infecção por HTLV-1 por neutralização direta, a partir de mudanças conformacionais na estrutura de gp46. Neste estudo, foi utilizado rato como modelo animal. Foi demonstrado que anticorpos monoclonais são transferidos de ratas grávidas para os ratos recém-nascidos, e que o mAb foi efetivo em proteger esses ratos contra a infecção intraperitoneal. Este resultado sugere que esta mAbs poderá ser utilizado na imunização passiva contra infecções horizontais e verticais. Porém para o controle do HTLV-1, ainda seria necessário a combinação da imunização passiva com uma vacina (imunização ativa).

Devido à ineficiência dos tratamentos e a dificuldade em desenvolver uma vacina protetora, o desenvolvimento de uma vacina terapêutica é sugerida. A vacina terapêutica para o HTLV-1 tem o intuito de induzir a proliferação de células T CD8⁺ citotóxicas contra uma proteína alvo do HTLV-1, devido à capacidade dos CTL em reconhecer e destruir as células infectadas. A vacina terapêutica visa controlar a infecção, diminuir a carga proviral, prevenir o desenvolvimento de doenças associadas à infecção e, por consequência, melhorar a qualidade de vida dos pacientes. A proteína HBZ vem se tornando um novo alvo para terapias. Além de ter um papel crucial na patogênese e na progressão da infecção, ela é

constantemente expressa nas células de pacientes apresentando todos os quadros clínicos. A geração de uma vacina terapêutica contra HBZ seria capaz de induzir uma resposta citotóxica específica que é capaz de controlar a infecção, resultando na prevenção do desenvolvimento e tratamento das doenças associadas à infecção por HTLV-1.

MacNamara et al. (2010) verificaram, pela predição de epitopo, que a proteína HBZ apresenta epitopos que se ligam fortemente aos HLA de classe I, A*0201 e Cw*0801, alelos associados com a redução da carga proviral e da progressão da doença. Pacientes assintomáticos apresentam essas ligações mais fortes que pacientes com HAM/TSP e, consequentemente, apresentam menor carga viral. Foi verificado que há CTL específicos contra HBZ no sangue periférico de indivíduos infectados. Foi demonstrado também que um clone de CTL capaz de reconhecer o epitopo $_{26}\text{GLLSLEEEL}_{34}$ da proteína HBZ é capaz de lisar as células T CD4^+ infectadas do sangue periférico de três entre quatro pacientes HLA compatível. MacNamara et al. (2010) hipotetizam que a ação de linfócitos T CD8^+ específicos para HBZ irá prevenir a proliferação de células infectadas, impedindo a persistência da infecção e, por consequência, reduzindo o risco de desenvolvimento de HAM/TSP.

No estudo de Sugata et al. (2015), foi construído *Vaccinia virus* (amostra atenuada LC16m8) recombinante contendo peptídeos de HBZ e foi realizado a vacinação de camundongos e macacos. Foi observada a indução de linfócitos T CD8^+ específicos para os peptídeos de HBZ, e foi verificado em ensaios de citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* que houve a indução de resposta citotóxica de memória contra as células T CD4^+ que expressam a HBZ. Foi mostrado também que esta vacina foi capaz de proteger parcialmente camundongos com linfoma de células T que expressam HBZ. Neste experimento, o vírus vaccínia recombinante expressando o peptídeo $_{157}\text{QELGIDGYTRQLEGEVESLE}_{176}$ foi o que apresentou maior atividade lítica, sendo o mesmo indicado como o candidato para uma vacina peptídica de HBZ. Esta vacina foi capaz de aumentar a sobrevivência de camundongos e pode ser eficaz na prevenção e/ou no controle da ATL.

1.10 VÍRUS RECOMBINANTES COMO AGENTES VACINAIS

Através do domínio da tecnologia do DNA recombinante, vírus podem ser geneticamente modificados. Quando essa modificação é realizada objetivando a expressão de genes heterólogos, estes são chamados de vetores virais. A construção destes vetores é desejada para quatro objetivos principais: produção de vacinas, produção de proteína em cultura celular, terapia gênica e produção de agentes antitumorais. Diversos vírus de

diferentes famílias vêm sendo utilizados como vetores virais, destacando-se *Adenovirus*, *Retrovirus*, *Baculovirus* e *Poxvirus* (GILBERT; MASSIE, 2011).

A utilização da vacinação é um dos principais métodos utilizados para a prevenção e controle de doenças infecciosas. Diversas doenças são controladas ou já foram erradicadas devido à vacinação. Porém as metodologias tradicionais de imunização muitas vezes falham no desenvolvimento de uma resposta imune protetora para vários patógenos, devido a isso, novas estratégias de imunização vêm sendo estabelecidas. O desenvolvimento de vacinas baseadas em vetores virais recombinantes se tornou uma estratégia de imunização. Estas vacinas apresentam diversas vantagens sobre as vacinas tradicionais. Estes vetores são capazes de expressar antígenos exógenos dentro das células do organismo, simulando uma infecção natural. A presença de antígenos dentro da célula, facilita o processamento intracelular, resultando na apresentação de antígenos por moléculas de MHC de classe I, e consequentemente gerando uma resposta celular robusta (ROCHA et al., 2004).

Vacinas terapêuticas, ao contrário de vacinas profiláticas, não são desenvolvidas como medida profilática, e sim como um método de tratamento. Estas são utilizadas para estimular o sistema imune contra um agente infeccioso já presente no hospedeiro, ou células cancerígenas. Vacinas terapêuticas baseadas em peptídeos recombinantes são capazes de induzir linfócitos citotóxicos específicos através do reconhecimento por MHC de classe I; os CTL são capazes de prevenir, controlar ou curar doenças infecciosas crônicas e até o câncer (VITIELLO et al., 1995). Além disso, o uso de proteínas multiepitopo pode ainda maximizar esta resposta, gerando uma resposta imune para diferentes epitopos de uma mesma proteína (SUHRBIER, 1997). Dakappagari et al. (2005) mostraram que peptídeos multietopo derivados de antígenos tumorais são capazes de elevar respostas T citotóxicas específicas em camundongos transgênicos para a molécula HLA-A0201.

1.10.1 Plataforma MVA

Como mencionado, os poxvírus são importantes vetores virais. Os poxvírus pertencem à família *Poxviridae*, são vírus complexos, envelopados e composto por uma fita dupla de DNA variando entre 130 a 300 kb que apresentam sítio de replicação citoplasmática (MOSS, 2013). A partícula viral dos poxvírus é envelopada e apresenta forma ovóide ou tijolo com as seguintes dimensões, 310 x 240 x 140 nm, contendo cerca de 100 proteínas. O nucleocapsídeo do vírus apresenta forma bicôncava e é flanqueado por corpúsculos laterais e envolto por uma bicamada de membrana nuclear. O nucleopasídeo apresenta estrutura tubular dobrada em três

sessões, no interior dessa estrutura se encontra o DNA viral. O vírion também carrega diversas enzimas que são responsáveis pelo início da replicação viral (Figura 13) (CONDIT, 2011).

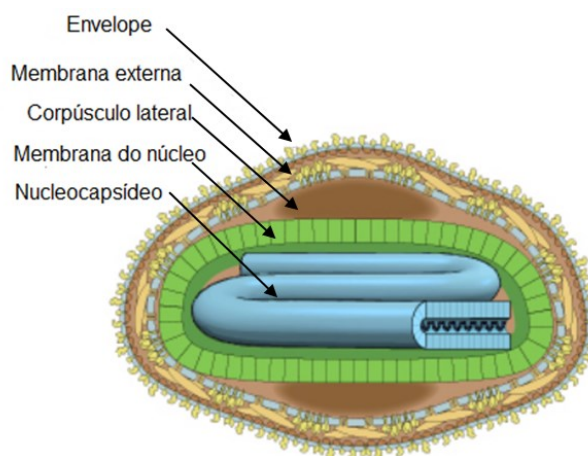


Figura 13 - Representação esquemática da partícula viral do Poxvirus. Fonte: Adaptado de POXVIRIDAE, 2014.

A família *Poxviridae* é dividida em oito gêneros, sendo que o gênero de maior interesse para os humanos é o gênero *Orthopoxvirus*. Este compreende os vírus, *Variola virus* (VARV) e o *Vaccinia virus* (VACV). O VARV, o poxvírus mais mortal, é o agente da varíola, doença fatal responsável pela epidemia mais severa na história da humanidade, que teve sua erradicação em 1977. O VACV, causador da varíola bovina, foi utilizado na campanha de erradicação da varíola. A imunização foi possível devido à natureza altamente conservada das proteínas estruturais dos *Orthopoxvirus*, que proporciona proteção cruzada entre vírus do mesmo gênero. Com a erradicação da varíola e os avanços da engenharia genética de vírus recombinantes, foi possível demonstrar a viabilidade do VACV recombinante em proteger contra patógenos específicos (JACOBS et al. 2009; SANCHÉZ-SAMPEDRO et al. 2015).

Os VACV engenheirados para a expressão genes de exógenos são uma importante ferramenta no desenvolvimento de vacinas. Estes possuem diversas vantagens como vetores virais, dentre elas, a possibilidade de inserção de genes grandes, controle preciso da expressão do gene recombinante, ausência de persistência e integração genômica e alta imunogenicidade como uma vacina. Uma preocupação no uso de vetores virais é a segurança destes, pois os vírus podem sofrer mutações facilmente. Entre os *Vaccinia virus*, o vírus *Vaccinia Ankara Modificado* (MVA) é uma das linhagens virais mais sugeridas na pesquisa clínica (DREXLER; STAIB; SUTTER, 2004).

O MVA foi desenvolvido através de atenuação por 570 passagens celulares do vírus *Vaccinia virus* Ankara em células de embriões de galinha em 1960 para ser utilizado como um vetor seguro. Devido as passagens celulares, o MVA perdeu cerca de 30 kb do seu genoma, envolvendo genes responsáveis pela interação com o hospedeiro e evasão do sistema imune. Resultando na incapacidade de infectar e multiplicar em uma ampla gama de células, sendo incapazes de multiplicar em células humanas e apenas se multiplicar em células fibroblásticas de embriões de galinha (CEFs) e células de rim de *hamster* neonato (BHK-21). Apesar de não se multiplicar, o MVA sintetiza todos os componentes necessários para a replicação, o que possibilita a expressão de genes heterólogos. Devido a estas modificações, o MVA é considerado um vetor seguro, que pode ser administrado até em indivíduos imunossuprimidos. Por ser um vírus atenuado, isto impede o espalhamento do vírus para o ambiente ou indivíduos não vacinados. A construção do MVA recombinante é realizada através da recombinação homóloga entre o genoma viral e um plasmídeo contendo o DNA exógeno, duas regiões flanqueadoras e um repórter (Figura 14) (DREXLER; STAIB; SUTTER, 2004).

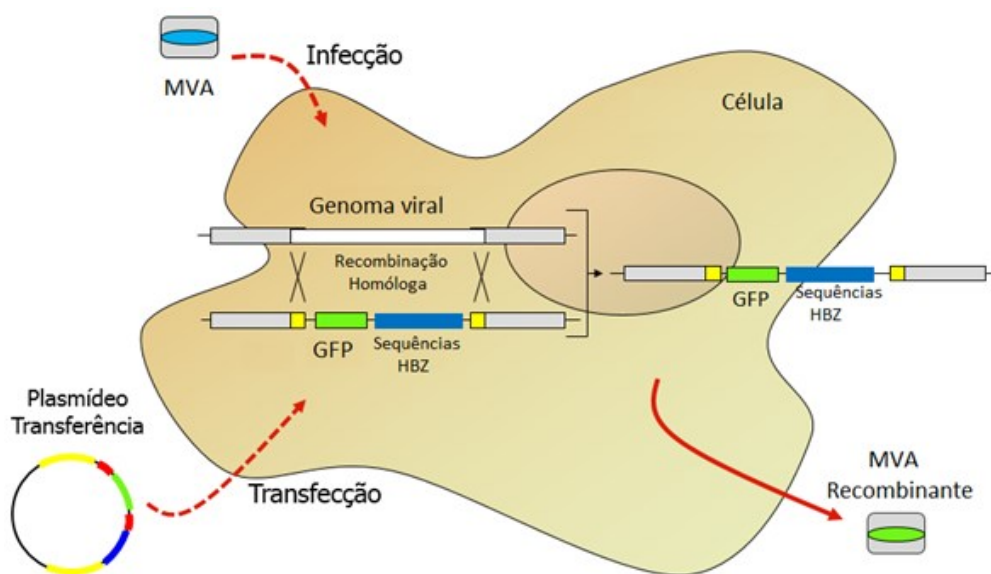


Figura 14 – Esquema da construção do MVA recombinante por recombinação homóloga. Nesta ilustração, células permissíveis são infectadas pelo vírus MVA selvagem e posteriormente transfectadas com o plasmídeo de transferências. No citoplasma da célula, ocorre a recombinação homóloga entre o genoma viral e o plasmídeo. Dessa forma, são gerados vírus recombinantes contendo a informação gênica contida no plasmídeo de transferência. É utilizado o GFP, como gene repórter para a identificação de clones recombinantes. Fonte: Cedida por Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (adaptado).

Em 1970, o MVA foi utilizado como vetor para imunização contra a varíola, mais de 100.000 pessoas foram vacinadas e este vetor mostrou-se seguro e eficiente, sem apresentar efeitos adversos. Durante o processo de atenuação, o MVA perdeu genes responsáveis pela

evasão imune que tinham como alvo as citocinas. Os defeitos nestes genes inibitórios provavelmente são responsáveis pela síntese de citocinas induzidas especificamente por MVA. Por exemplo, a inativação do gene de resistência *E3L* aumentou a produção de interferon tipo I, propondo que o MVA é capaz de estimular o sistema imune inato melhor que o *Vaccinia virus* não atenuado. O MVA é capaz de gerar tanto resposta imune celular quanto humoral assim como o *Vaccinia virus* não atenuado, e experimentalmente gerou resposta protetora similar ao *Vaccinia virus* não atenuado contra *Orthopoxvirus*. Diversos experimentos de infecção em diferentes modelos animais comprovaram a avirulência e capacidade imunoestimulante do MVA. Além disso, eles ainda podem ser liofilizados e administrado por diferentes rotas. Vacinas contra doenças virais vêm sendo desenvolvidas utilizando o MVA como vetor, por exemplo, HIV, influenza, sarampo e dengue (DREXLER; STAIB; SUTTER, 2004).

Outra preocupação no uso de MVA como vetor para imunização é pré-existência de anticorpos anti-vaccínia. Pois estes anticorpos poderiam reconhecer o vetor e gerar uma resposta específica para este, impedindo a indução da resposta contra a proteína exógena. Porém em estudos realizados em camundongos, foi demonstrado que a imunidade pré-existente não interferiu nas imunizações subsequentes com MVA expressando a glicoproteína gB do citomegalovírus. (DREXLER; STAIB; SUTTER, 2004; RAMÍREZ et al., 2000).

Diversos experimentos de infecção em diferentes modelos animais e humanos comprovaram a avirulência e capacidade imunoestimulante do MVA. Além disso, eles ainda podem ser liofilizados e administrado por diferentes rotas. Por estes motivos, o MVA vem sendo testado como vacina terapêutica para infecções crônicas, como HIV, HCV, HPV e *Mycobacterium tuberculosis*, já em teste clínicos de fase I, IIa e IIb (BOUKHEBZA et al. 2012; DREXLER; STAIB; SUTTER, 2004; ZAJAC et al., 2016).

1.10.2 Imunologia da Infecção por MVA Recombinante

Para a utilização de vetores vacinais baseados na plataforma MVA é necessário o conhecimento das bases imunológica deste vírus. A compreensão de como é realizado a apresentação dos antígenos e o perfil das respostas imunológicas induzidas pelo MVA é crítica para o desenvolvimento de vacinas. Já foi reportado que o MVA é capaz de induzir a resposta inata como a adaptativa, tanto a humoral, quanto a celular (PRICE et al. 2013).

O reconhecimento deste vetor pela resposta imune inata é um fator que contribui para sua imunogenicidade. A infecção por VACV é notada pela síntese e secreção de proteínas que

se ligam às moléculas do sistema imune inato, porém no processo de atenuação do MVA, ele perdeu a capacidade de expressar essas moléculas antagonistas. Como resultado, o MVA é capaz de induzir vias do sistema imune inato (PRICE et al. 2013). Em modelo de infecção em camundongos, foi verificado que a infecção por MVA é capaz de induzir uma robusta resposta inata em células peritoniais, no lavado peritoneal e em esplenócitos. Esta indução foi caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 β , L-6, IL-12P40), quimiocinas (IP-10/CXCL10, RANTES/CCL5, MCP-5/CCL12, MIP-2/CXCL2) e interferon do tipo I (IFN β). Já em modelo de infecção em sangue de humano, houve também a indução da resposta inata, sendo esta aracterizada por uma abundante produção de quimiocinas e uma menor produção de citocinas pró-inflamatórias. Ainda foi demonstrado que a indução de citocinas, quimiocinas e IFN β ativada através da detecção do MVA pelos sensores, TLR2, TLR6, MyD88, MDA-5-IPS-1 e inflamassoma NALP3, cruciais na iniciação da resposta antiviral (DELALOYE et al. 2009). A inabilidade do MVA em evadir do sistema imune, atribuído ao fenótipo atenuado, gera ao vírus robusta propriedade imunoestimuladora (PRICE et al. 2013).

Uma resposta celular robusta contra os antígenos virais é o propósito de vacinas e imunoterapias. Em estudos *in vitro* e *in vivo*, foi demonstrado que células dendríticas, infectadas com MVA, expressam antígenos e os apresentam à linfócitos TCD8⁺. A apresentação de antígenos às células dendríticas ocorre via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I. Kastenmuller et al. (2007), verificou que indução de linfócitos TCD8⁺ ocorre principalmente através da apresentação cruzada, quando o antígeno é produzido por outra célula e é adquirido pelas células dendríticas, principalmente de antígenos de longa duração.

1.11 APRESENTAÇÃO DE ANTÍGENOS/PEPTÍDEO SINAL

Os peptídeos são produtos da proteólise, e existem dois principais sistemas de proteólise: a mediada por proteassoma ou mediada por lisossomos. A proteólise contribui para o reconhecimento dos peptídeos por células T, através da ligação com MHC. Proteínas que são sintetizadas no citosol, como proteínas virais, são processadas pelos proteassomas, enquanto proteínas que são internalizadas por uma célula de fonte exógena são degradadas por lisossomos. Peptídeos gerados pelo proteassomas são translocados para o retículo endoplasmático pelo transportador associado ao processamento de antígenos (TAP). No retículo endoplasmático, os peptídeos se ligam a MHC de classe I. Os peptídeos de fonte

exógena são endocitados ou fagocitados, após a degradação lisossomal, estes são ligados a MHC de classe II. Porém, em ambos os casos, as duas classes de MHC podem reconhecer os peptídeos das duas fontes, como na apresentação cruzada. A apresentação cruzada, ocorre quando peptídeos endocitados ou fagocitados se ligam a moléculas de MHC-I. Isto ocorre por que células dendríticas são capazes de translocar a proteína para o citosol e seguir com a degradação proteassomal e dirigir até o retículo endoplasmático. A apresentação cruzada é muito importante na iniciação das respostas T CD8⁺ (BLUM; WEARSCH; CRESSWELL, 2013).

Os peptídeos sinal são aminoácidos curtos (13-50 aa) normalmente localizado na região N-terminal de proteínas que são endereçadas à secreção ou integração com a membrana celular. O peptídeo sinal é composto por três regiões: a central hidrofóbica e a flangeadora N- e C- terminal. Após a tradução da proteína, o peptídeo sinal é incorporado na membrana do retículo endoplasmático e é removido da proteína madura por uma protease. Uma das barreiras em relação a apresentação de antígeno é afinidade de peptídeos com a TAP, pois esta está ligada a probabilidade da apresentação à MHC de classe I. Porém o peptídeo sinal é capaz de acessar o retículo endoplasmático independente da interação com TAP. A apresentação independente de TAP é capaz de neutralizar os mecanismos de escape do sistema imune utilizado por muitos patógenos, que está relacionada com a regulação negativa de MHC de classe I. Além disso, esta forma de apresentação pode aumentar a apresentação de epitopos a MHC de classe I cerca de 2000 vezes. Dessa forma, a presença de peptídeo sinal, pode aumentar a imunogenicidade de peptídeos (KOVJAZIN; CARMON, 2014).

2 JUSTIFICATIVA

O vírus linfotrófico de células T humanas é um retrovírus que infecta cerca de 5 a 10 milhões de pessoas no mundo, em diferentes áreas endêmicas. O Brasil é um país endêmico para o HTLV-1, sendo estimado que cerca de 2,5 milhões de pessoas são infectadas. O Brasil apresenta o maior número absoluto de portadores de HTLV-1 no mundo, e, apesar deste fato, a infecção é ainda negligenciada em nosso país. A infecção com HTLV-1 pode resultar no desenvolvimento de doenças oncológicas e inflamatórias progressivas com prognóstico grave. As principais doenças desenvolvidas são a leucemia/linfoma da célula T adulta e a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), que apresentam alta taxa de mortalidade e morbidade, respectivamente. Apesar de em torno de 5% das pessoas infectadas apresentarem os piores desfechos, os pacientes assintomáticos também podem apresentar uma série de doenças inflamatórias e outras intercorrências clínicas e co-infecções que interferem na sua qualidade de vida e causam um alto impacto no Sistema Único de Saúde. Além do prognóstico desfavorável, as terapias disponíveis até hoje para ATL não são eficientes ou possuem alto risco de vida para os pacientes, da mesma forma, para HAM/TSP, nenhuma terapia específica e eficaz foi desenvolvida. Devido ao desfecho das doenças e à falta de terapias eficazes, torna-se necessário o desenvolvimento de novas terapias. Uma estratégia para controlar a infecção e prevenir o desenvolvimento das patologias seria a indução da produção de linfócitos T CD8⁺, pois estes são capazes de identificar as células infectadas e destruí-las, tendo por consequência a diminuição da carga proviral.

O HTLV-1 expressa várias proteínas regulatórias responsáveis pela multiplicação viral e patogênese. Mais recentemente, a proteína antisense HBZ foi descoberta, e foram estudados diversos mecanismos modulados pela mesma que induzem a patogênese, como a proliferação celular, evasão do sistema imunológico, entre outros. Além disso, esta proteína é constantemente expressada. Devido a essas características, a proteína HBZ se torna um alvo para o desenvolvimento de novas terapias.

Neste sentido, uma vacina terapêutica baseada em peptídeos imunogênicos da proteína HBZ seria capaz de identificar as células que expressam a proteína HBZ e promover sua lise, através da indução de respostas citotóxicas, resultando na diminuição da carga proviral. A redução da carga proviral é uma forma de controlar a infecção por HTLV-1 e, conseqüentemente, evitar seus piores desfechos, melhorando a qualidade e sobrevida dos pacientes infectados.

Uma estratégia para desenvolver vacinas terapêuticas é o uso de vetores virais recombinantes. Os poxvírus se destacam como vetores virais, principalmente o vírus atenuado Vaccinia Ankara Modificado (MVA). O MVA apresenta várias vantagens, como a expressão eficiente de proteínas heterólogas, a fácil manipulação, a indução de respostas celulares robustas e a segurança como vetor. Destaca-se, ainda, que esta plataforma é utilizada em todo o mundo, com aprovação do uso em seres humanos, como no caso de vacinas virais e parasitárias desenvolvidas, já na fase 1,2 e 3 de triagem clínica.

Portanto, este trabalho propõe a construção de um vírus recombinante MVA expressando uma proteína contendo múltiplos peptídeos da proteína HBZ com possível potencial imunogênico. A importância dessa biotecnologia é o seu potencial como uma vacina terapêutica contra a infecção pelo HTLV-1.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

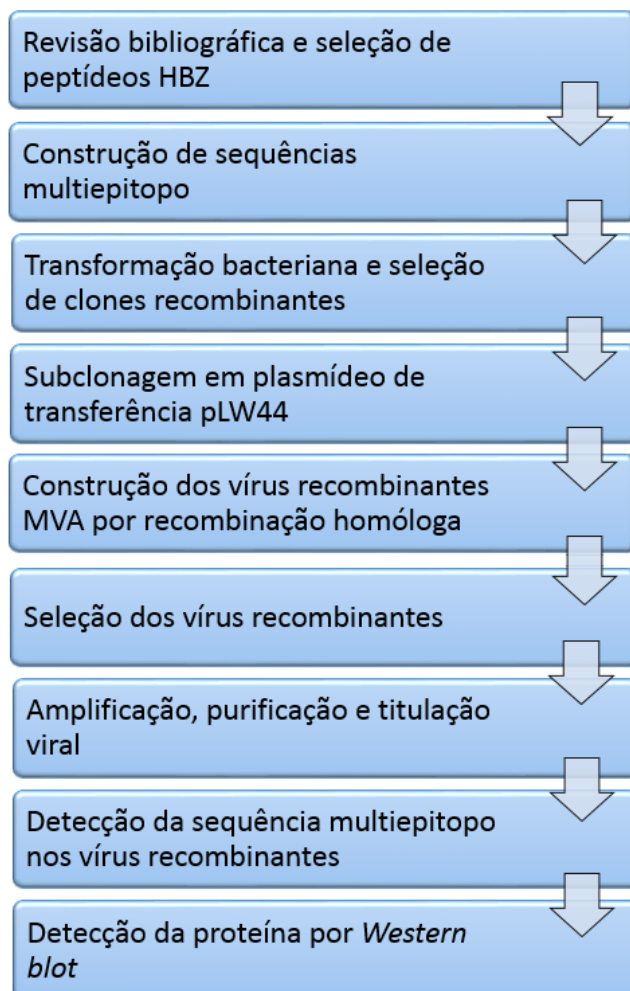
Construir vírus recombinantes na plataforma Vaccinia Ankara Modificado (MVA) para a expressão de proteínas multiepitopo baseada em peptídeos da proteína HBZ do HTLV-1.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Selecionar peptídeos da proteína HBZ com revisão da literatura e ferramentas de predição de epitopo *in silico*.
- 2) Construir gene sintético a partir das sequências selecionadas, contendo ou não a sequência de peptídeo sinal, além das sequências de etiqueta FLAG, terminação de transcrição e tradução, e sítios de restrição para sistemas de clonagem.
- 3) Gerar os plasmídeos de transferência pLW44 com as sequências multiepitopo.
- 4) Gerar, por meio de recombinação homóloga, os vírus MVA recombinantes contendo as sequências multiepitopo.
- 5) Confirmar a expressão da proteína multiepitopo nos vírus recombinantes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTRATÉGIA DE TRABALHO



4.2 SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS IMUNOGÊNICOS E CONSTRUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS MULTIEPITOPO

A seleção de peptídeos com potencial imunogênico da proteína HBZ foi baseada em trabalhos já realizados e em análises *in silico*. O desenho da sequência multiepitopo foi baseada nos seguintes artigos: MacNamara et al. (2010) e Sugata et al. (2015), pois durante o desenvolvimento destes dois trabalhos, os pesquisadores identificaram epitopos da proteína HBZ com capacidade de induzir a resposta de linfócitos T CD8 citotóxicos. A análise *in silico*

foi realizada utilizando as seguintes ferramentas de predição de epitopo: *NetMHCpan* 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCpan/>), *NetCTL* 1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/>) e *IEDB – MHC-I Binding Predictions* (<http://tools.iedb.org/mhci/>). No *NetMHCpan* 4.0 foi considerando epitopos de 9 e 10 aminoácidos ligantes ao alelo HLA-A*02, com os seguintes “*thresholds*”: peptídeos de fraca ligação: 2.0 e peptídeos de alta ligação: 0,5. No *NetCTL* 1.2, os epitopos foram preditos usando o MHC supertipo A2 e “*threshold*” de 0.75. No *IEDB – MHC-I Binding Predictions* foi considerado o alelo HLA-A*02:01 e epitopos de 9 a 12 aminoácidos. Os epitopos foram selecionados da análise dos “*scores*” das três ferramentas. Foram utilizadas sequências de aminoácidos da proteína HBZ depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Foi realizado o alinhamento de todas as sequências depositadas referente a sHBZ pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.2.5 para verificar a conservação dos epitopos entre as sequências depositadas.

Na construção das sequências peptídicas multiepitopo, cada sequência da proteína HBZ selecionada foi intercalada por um espaçador flexível composto por glicina e serina “GSGSG” (DIPTI; JAIN; NAVIN, 2006). Duas sequências multiepitopo foram construídas, HBZ-CHI e HBZp-CHI, apresentando os mesmos peptídeos imunogênicos, sendo a diferença entre elas a presença de peptídeo sinal tPA, que contém a sequência “MDAMKRGLCCVLLCGAVFVDSVTG”, no início de uma das sequências (HBZp-CHI) (WEN et al., 2010). A presença do peptídeo sinal induz a secreção da proteína expressada. A predição do peptídeo sinal foi realizada na ferramenta *SignalP* 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Para verificar a expressão da proteína, foi adicionado a etiqueta *FLAG*, de sequência “DYKDDDDK”, ao final da proteína. A jusante a *FLAG* foi adicionada uma sequência nucleotídica de terminação da transcrição para o MVA “TTTTTGT” e de tradução “TAA”. Para realizar a subclonagem para o plasmídeo de transferência foram adicionados sítios de restrições em ambas terminações, *SmaI* na terminação 5’ e *PstI* na terminação 3’. As sequências foram desenhadas com o auxílio do programa *SnapGene* 1.4.1. As sequências construídas foram sintetizadas em plasmídeos pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp pela empresa GenOne.

4.3 GERAÇÃO DE BACTÉRIAS QUIMIOCOMPETENTES

Foi preparado um pré-inóculo de bactérias *Escherichia coli* XL10-Gold® (Agilent) em 5 mL de meio de cultura LB, este foi incubado *overnight* a 37°C com agitação 200 rpm

(Forma Orbital Shaker M420 Series, Thermo Scientific). O pré-inóculo foi transferido para 200 mL de meio LB e foi incubado nas mesmas condições até atingir D.O.₆₀₀ entre 0,4 e 0,6. A cultura foi mantida em gelo por 15 minutos e centrifugado à 3000 rpm por 15 minutos a 4°C (Jouan BR4i Rotor AB 50.10). O *pellet* foi ressuscitado em 3 mL de Cloreto de Cálcio (CaCl₂) 100 mM, a solução foi incubada em banho de gelo por 20 minutos. A solução foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e o *pellet* de bactérias foi ressuscitado em 1mL de CaCl₂ 100 Mm, 10% glicerol. As bactérias quimiocompetentes foram armazenadas em ultrafreezer -80°C.

4.4 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA

Os dois plasmídeos pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp (HBZ-CHI e HBZp-CHI) foram diluídos seguindo orientações do fabricante e foram utilizados para transformar bactérias *Escherichia coli* XL10-Gold® (Agilent) quimiocompetentes, para gerar o estoque dos respectivos plasmídeos. Em tubos contendo 100 µL de células bacterianas foram adicionados entre 0,1 – 50 ng de plasmídeos, e foram incubados em banho gelo por 30 minutos. A incorporação dos plasmídeos ocorreu por choque térmico colocando os tubos em banho térmico a 42 °C por 40 segundos e transferindo rapidamente para banho de gelo por mais 2 minutos. Foram adicionados 0,9 mL de meio de cultura LB pré-aquecido nos tubos, e estes foram incubados por 1 hora a 37°C e 200 rpm. Foram semeados volumes de 10 µL e 100 µL em placas de Petri contendo LB ágar suplementado com ampicilina (100 µL/mL), as placas foram incubadas *overnight* a 37 °C, e foi observado o crescimento de colônias bacterianas. O mesmo processo foi realizado para testar a eficiência da competência da bactéria com 10 ng do plasmídeo pUC 18.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDEAL

No dia posterior a transformação bacteriana, as colônias que cresceram na placa foram coletadas com o auxílio de uma ponteira e transferidos para tubos Falcon contendo 10 mL de meio de cultura LB com ampicilina (100 µL/mL) e foram incubados a 37 °C com agitação de 200 rpm *overnight*. No dia posterior, foi observada a turvação do meio de cultura, indicando o crescimento bacteriano. A extração de DNA plasmideal foi realizada com 5 mL da cultura utilizando o QIAprep Spin MiniPrep Kit (QIAGEN) seguindo o protocolo estabelecido pelo

fabricante. A quantificação do DNA eluído em H₂O livre de nucleases foi realizado por *NanoVue Plus Spectrophotometer* (GE Healthcare). Ao restante das culturas foram adicionados 50% de glicerol e foram estocados em ultrafreezer -80°C.

4.6 SELEÇÃO DE CLONES RECOMBINANTES POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA

A seleção de clones recombinantes que apresentam os plasmídeos pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp (HBZ-CHI e HBZp-CHI) foi realizada pelo ensaio de restrição enzimática com as enzimas de restrição *SmaI* e *PstI* (10U/ μ L) (Promega). As digestões enzimáticas foram realizadas utilizando 1500 ng do plasmídeo, 1 μ L de tampão da enzima J 10X, 1 μ L da enzima *SmaI*, 2 μ g de BSA e H₂O livre e nucleases completando 10 μ L de volume final. As reações foram incubadas a 25 °C por 2 horas e a enzima foi inativa a 65°C por 15 minutos. Aos produtos das primeiras reações foram adicionados, 2 μ L do tampão de enzima H 10X, 1 μ L da enzima *PstI* e H₂O livre e nucleases completando 20 μ L de volume final. As reações foram novamente encubadas a 37°C por 2 horas. A confirmação da digestão enzimática foi por eletroforese (Loccus) em gel de agarose 1% em TBE 0,5X, acrescido de 0,5 μ g/mL de brometo de etídio a 100 V. Através do transiluminador ultravioleta foi confirmado a presença de 2 bandas contendo o peso molecular esperado do plasmídeo e da sequência clonada.

4.7 SUBCLONAGEM DA SEQUÊNCIA MULTIEPITOPO EM PLASMÍDEOS DE TRANSFERÊNCIA

Para realizar a recombinação homóloga para construir os vírus MVA recombinantes é necessário fazer a subclonagem dos cassetes gênicos (HBZ-CHI e HBZp-CHI) nos plasmídeos de transferência pLW44. O plasmídeo pLW44 foi cedido pelo Dr. Bernard Moss (Laboratory of Viral Diseases, NIAID, NIH, EUA). O pLW44 possui a estrutura do plasmídeo pGEM-4Z e apresenta as sequências flanqueadoras homólogas às sequências do genoma do vírus MVA. Através da recombinação homóloga as sequências multiepitopos foram transferidas para o locus da Região de Deleção III do genoma viral, a expressão da proteína exógena é controla pelo promotor forte mH5, que é capaz de garantir a expressão durante todo o ciclo de replicação. Para a seleção de vírus recombinantes, o pLW44 possui um gene codificador da proteína fluorescente verde (GFP), a qual pode ser verificado na presença de luz ultravioleta (510 nm) (Figura 15).

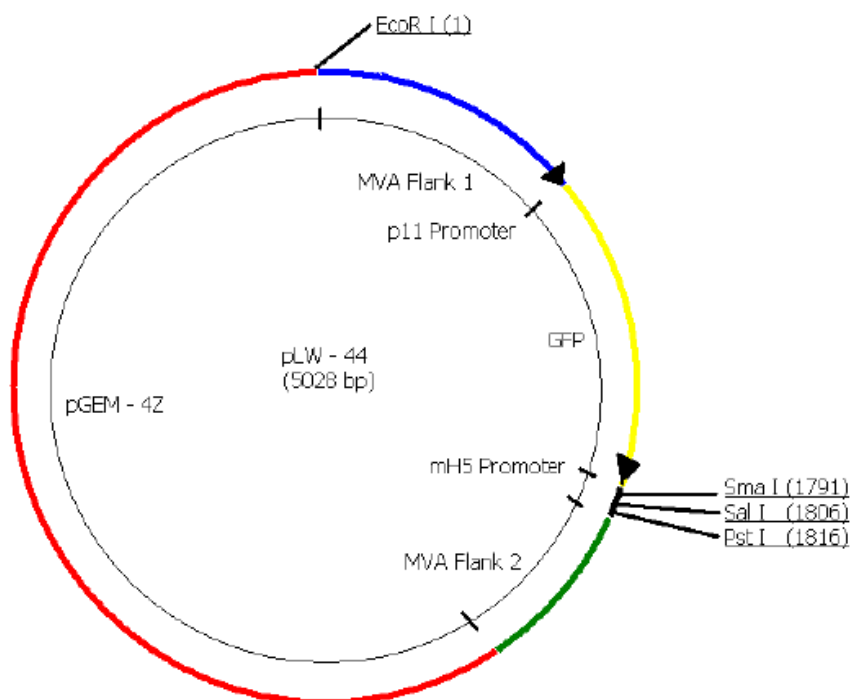


Figura 15 – Figura esquemática do plasmídeo pLW44. Este plasmídeo contém a estrutura genética do vetor de clonagem Pgem-4Z. O plasmídeo possui uma região flanqueadora (MVA Flank1), um promotor p11, uma sequência codificadora da proteína GFP, um promotor mH5, um sítio de clonagem que apresenta as enzimas, SmaI, SalI e PstI, e outra região flanqueadora (MVA Flank2).

Para realizar a subclonagem dos plasmídeos pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp contendo os cassetes gênicos (HBZ-CHI e HBZp-CHI) no pLW44, o procedimento de digestão enzimática realizado foi o mesmo utilizado na seleção de clones recombinantes, item 4.6. Em seguida, após a eletroforese do material digerido, as bandas referentes às sequências do estudo e ao plasmídeo pLW44 linearizado foram cortadas do gel de agarose com o auxílio de um bisturi. Os fragmentos de DNA foram purificados pelo método de *freeze-squeeze* (TAUTZ; RENZ, 1983). Os pedaços de agarose foram picotados com o auxílio do bisturi e foram incubados *overnight* a -20°C . As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 15 minutos (microcentrifuga MicroCl-17R, Thermo Scientific). O sobrenadante contendo o DNA foi coletado.

A ligação entre as duas sequências do estudo aos respectivos plasmídeos de transferências pLW44 foi realizado na proporção inserto/vetor de 3/1, utilizando 100 ng de vetor. A reação foi realizada utilizando 1 μL de T4 DNA ligase (1-3U/ μL) (Promega), 5 μL de tampão da ligase 2X e H_2O livre de endonucleases até completar o volume final de 10 μL . As reações homogêneas foram incubadas a 37°C por 1 hora. Após a reação de ligação, os plasmídeos subclonados foram utilizados para transformar bactérias competentes *Escherichia coli* XL10-Gold, como descrito no item 4.4. Foi realizada a extração do DNA plasmídeo dos

clones recombinantes como descrito no item 4.5 e estes foram confirmados por restrição enzimática como descrito no item 4.6. Assim foram gerados os plasmídeos denominados pLW44-HBZ-CHI e pLW44-HBZp-CHI.

4.8 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DOS PLASMÍDEOS

Para sequenciar os dois plasmídeos construídos, pLW44-HBZ-CHI e pLW44-HBZp-CHI, foi utilizado 100 ng de cada plasmídeo, adicionados de 1 uL de iniciador (100 uM) em um volume total de 7,5 uL. Foi desenhado pares de iniciadores específicos para amplificação de insertos presentes no pLW44, o primer pLW44 *forward* (5' AAA GAC CCC AAC GAG AAG C 3') e o pLW44 *reverse* (5' GTC TGA GGA AAA GGT GTA GCG 3'). O iniciador *forward* se anela à porção final do Flanco 1, enquanto o *reverse* à porção inicial do GFP. As propriedades dos iniciadores estão descritas na Tabela 1. Os iniciadores foram sintetizados pela empresa *IDT Integrated DNA Technologies*.

Tabela 1 - Propriedades dos iniciadores pLW44

Iniciador	Sequência	Tamanho (bases)	Tm (°C)	CG%	Hairpin	Single Dimer ΔG	Hetero Dimer ΔG
pLW44 <i>Forward</i>	5'AAAGACCCCAA CGAGAAGC 3'	19	55,2	52,6	-	-3,61	-4,52
pLW44 <i>Reverse</i>	5'GTCTGAGGAAA AGGTGTAGCG 3'	21	55,4	52,4	0,92	-3,61	-4,52

O sequenciamento dos plasmídeos foi feito pelo método de Sanger em sequenciador automático capilar ABI3130, utilizando-se polímero de performance otimizada (POP-7) e BigDye v3.1, pela empresa *Myleus Biotechnology*.

A análise dos eletroferogramas gerados foi realizada pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.5*. Por este foram geradas sequências consensos entre as sequências *forward* e o reverso complemento das sequências *reverse*. Para a confirmação, foi feito o alinhamento das sequências sequenciadas com as desenhadas pela ferramenta *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

4.9 PRODUÇÃO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS

4.9.1 Produção de Células Fibroblásticas de Embriões de Galinha (CEFs)

Para a produção das células a serem utilizadas na geração dos vírus recombinantes, ovos embrionados de 10 dias foram higienizados com etanol 70%. Com o lado protuso para baixo, a parte superior foi quebrada com o auxílio de uma pinça, a casca foi removida até a linha da câmara de ar. Ao remover a membrana, o embrião foi exposto, este foi removido pelo pescoço e colocado em uma placa de petri contendo meio mínimo essencial *Eagle* (EMEM) (*Sigma-Aldrich*, EUA) suplementado com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 0,37%, antibióticos (estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$ e penicilina 100U/mL), antifúngico (fungizona 25 $\mu\text{g/mL}$). Foi removido com o auxílio de tesoura a cabeça e os membros superiores e inferiores, assim como os órgãos internos do embrião. O embrião limpo foi transferido para outra placa de petri contendo EMEM suplementado para a liberação de sangue. Após este processo, os embriões foram colocados em uma seringa 6cc e o êmbolo foi fortemente pressionado para um *erlenmeyer*. Foi adicionado 4 mL de uma solução de tripsina 0,25%, EDTA 0,02% (*Sigma-Aldrich*) por cada embrião. O *erlenmeyer* foi colocado em um agitador a 37°C durante 15 minutos, juntamente com uma barra magnética. Após esse tempo, a suspensão foi filtrada em um béquer através de uma gaze. Para parar atividade da enzima, foi adicionado o mesmo volume de meio *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM) (*Sigma-Aldrich*, EUA) suplementado igualmente descrito acima, porém houve a adição de 10% de soro fetal bovino (SFB) (*Gibco*, EUA). Essa suspensão foi centrifugada a 2500 rpm por 10 minutos (centrífuga NF 800R, NÜVE). O sedimento de células foi separado do sangue pela pipetagem e transferido para um novo tubo. As células foram lavadas com meio DMEM suplementado 10% SFB e novamente centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de meio DMEM suplementado por garrafa de cultivo celular de 75 cm^2 e foi transferido para essas contendo 12 mL de DMEM suplementado. As garrafas foram incubadas a 37°C, em uma atmosfera com 5% de CO_2 (*Forma*TM Series II 3100, *Thermo Scientific*) até atingirem a confluência, observada em microscópio invertido.

4.9.2 Manutenção de Células

As CEFs produzidas foram subcultivadas a cada três dias para a manutenção da cultura celular, sendo utilizada até o terceiro repique celular. Após atingir confluências, o meio de cultura é descartado e a monocamada de células é lavada com tampão fosfato-salino (PBS) 1X (1.5 mM NaCl, 40 mM Na_2HPO_4 , 20 mM KH_2PO_4 , pH 7,2). Foi adicionado à monocamada de células 2 mL de tripsina 0,25%, a garrafa foi incubada a 37°C por 3 minutos até a monocamada se destacar. A atividade da tripsina foi interrompida com a adição de meio DMEM. A suspensão celular foi transferida para tubo Falcon de 50 mL e centrifugada a 2500 rpm por 5 minutos. O sedimento foi ressuspensionado em 30 mL de meio DMEM suplementado 10% SFB. A suspensão celular foi repartida para 6 garrafas, transferindo 5 mL de suspensão em cada, foi adicionado ainda 10 mL de meio em cada garrafa. As garrafas foram incubadas a 37°C, em uma atmosfera com 5% de CO_2 até atingir a confluência. Foram utilizadas também para a seleção e expansão de vírus recombinantes, as células BHK-21, que são células imortalizadas derivadas de rim de *hamster* neonato. As células BHK-21 foram mantidas seguindo este mesmo protocolo, sendo ressuspensionada em 1 mL e 1/10 da suspensão de células era transferido para a nova garrafa.

4.10 GERAÇÃO DE VÍRUS RECOMBINANTES

O vírus *Vaccinia* Ankara Modificado (MVA) selvagem foi gentilmente cedido pelo Dr. Bernard Moss (Laboratory of Viral Diseases, NIAID, NIH, EUA) na passagem número 581. Desde então este vírus é multiplicado em células BHK21 no Laboratório de Virologia Básica e Aplicada (LVBA). A construção dos vírus recombinantes é baseada na recombinação homóloga entre os vírus MVA e os plasmídeos de transferência em cultura de células. As células utilizadas neste procedimento foram as CEFs. Para este fim, placas de 6 poços contendo monocamadas de células CEF ($\sim 1 \times 10^6$ células/poço) em 500 μL meio de cultura DMEM suplementado sem SFB foram infectadas com o vírus MVA com uma multiplicidade de infecção de 1 (m.o.i = 1). Uma das cavidades foi reservada para o controle de células, sem a infecção por MVA. A adsorção do vírus foi realizada em estufa a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO_2 , como homogeneização de 15 em 15 minutos durante 1 hora. Em seguida, as monocamadas de células foram lavadas, duas vezes, com meio Opti-MEM I (GIBCO).

Para realizar a transfecção com o plasmídeo de transferência, foi feita uma solução contendo 2 μg de plasmídeo em 50 μL de Opti-MEM e outra solução contendo 5 μL de

lipofetamina 2000 (Invitrogen) e 45 μ L de Opti-MEM. As soluções foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Após este momento, as soluções foram misturadas e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Foi misturado à solução, 900 μ L de Opti-MEM. Após a lavagem das células previamente infectadas, foi adicionado a cada poço da placa, 1 mL dos plasmídeos. As placas foram incubadas novamente 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 5 horas. Após isso, o meio de cultura foi trocado por 2 mL de meio DMEM suplementado 5% SFB em cada poço. A placa foi incubada nas mesmas condições por 48 horas, período onde ocorreu a recombinação homóloga entre o genoma viral e o plasmídeo de transferência. A geração de MVA recombinantes foi observada em microscópio de fluorescência (*EVOS® FL Cell Imaging System, Thermo Fisher Cientific*). Após a observação ao microscópio, as células foram raspadas e adicionadas a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL para centrifugação a 14000 rpm por 3 minutos (microcentrífuga, *Eppendorf 5415C*). As células sedimentadas foram ressuspensas em 500 μ L de meio DMEM suplementado 5% SFB, e foram congeladas e descongeladas em nitrogênio líquido três vezes em ciclos de 30 segundos, para lisar as células e liberar as partículas virais. A suspensão viral foi estocada a -80°C.

4.11 SELEÇÃO DOS VÍRUS RECOMBINANTES

Os vírus MVA recombinantes foram selecionados por sucessivas seleções de unidades formadoras de foco em células CEF e BHK-21. Na primeira rodada de seleção foram utilizadas CEFs enquanto nas seguintes foram utilizadas células BHK-21. A diluição dos vírus recombinantes foi feita em meio DMEM suplementado 5% SFB. Foi feita duas diluições, 1/5 e 5/1 em volume total de 500 μ L. Depois, os vírus diluídos foram utilizados para infectar monocamadas de BHK-21 ($\sim 1 \times 10^6$ células/poço) em placas de 6 poços. As células foram incubadas para adsorção a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ e com homogeneização de 15 em 15 minutos por 1 hora. Após isso, foi adicionado à monocamada de células, uma solução de agarose 2% e meio 2X (GIBCO) suplementado com 5% SFB, antibióticos e antifúngicos. As placas foram novamente incubadas nas mesmas condições por 48 horas. Após a incubação, as monocamadas de células foram observadas em microscopia de fluorescência, as células que apresentaram fluorescência correspondem a expressão da proteína GFP, consequentemente a presença de MVA recombinante. Foram marcados pontos de coleta onde as células apresentam fluorescência verde, dando preferência para poços

infectados com vírus mais diluídos, com o intuito de eliminar contaminação com MVA selvagem. As células marcadas foram coletadas com ponteira e micropipetador, e transferidas para microtubos contendo 500 µL de DMEM 5%. Foi realizada a lise celular através do congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido por três vezes e sonicação, (*Branson 25 10EMTH – Sigma-Aldrich*) três ciclos de 30 segundos, e depois, a suspensão foi armazenada a -80°C. Foram realizadas sete rodadas de seleção para a obtenção de placas de foco grandes sem contaminação com MVA selvagem, sendo que a diluição do inóculo viral aumentava progressivamente. Nesta etapa, houve a geração dos vírus MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI.

4.12 EXTRAÇÃO DE DNA E DETECÇÃO DOS INSERTOS NOS VÍRUS RECOMBINANTES

Para a detecção do gene da proteína multiepitopo HBZ-CHI e HBZp-CHI nos vírus recombinantes selecionados, foi realizada a infecção de monocamadas de células CEFs. Os vírus foram diluídos na proporção 1/4 em DMEM 5% e células CEFs (1×10^6 células) em placa de 6 poços foram infectadas. Foi realizada a adsorção durante 1 hora, a 37°C e 5% de CO₂ com homogeneização. Posteriormente, os poços foram preenchidos com 2 mL de DMEM 5% e incubados por 48 horas a 37°C a uma atmosfera de 5% de CO₂. Um poço foi reservado para controle de células e outro poço foi infectado com MVA selvagem, como controle negativo. As monocamadas foram lavadas com PBS 1X e raspadas com êmbolo de seringa e centrifugadas por 5 minutos a 300x g. Os sedimentos foram suspensos em 200 µL de PBS 1X. O DNA total foi extraído utilizando kit de Extração de DNA (*DNeasy Blood & Tissue - Qiagen*), segundo as informações do fabricante. A amostra foi eluída em 100 µL de H₂O livre de nucleases e quantificada em *NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare)*.

O DNA obtido foi utilizado como molde para ensaios de Reação em cadeia da polimerase (PCR). A reação foi feita utilizando 500 ng de DNA, 5x *Colorless buffer* (Promega), 2 mM de MgCl₂ (Promega), 0,75 µM de cada iniciador pLW44 (descritos no item 4.8), 200 µM de dNTPs, 1,25U de *GoTaq Hot Start Polymerase* (Promega) e H₂O livre de nuclease, completando um volume final de 20 µL. A reação foi realizada em termociclador (*T100™ Thermal Cycler – BioRad*). Os ciclos de temperatura foram padronizados utilizando 100 ng de plasmídeo pLW44-HBZ-CHI. O ciclo foi assim definido: 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 61°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, e por último 72°C por 8 minutos. Os produtos da reação de PCR foram fracionados em eletroforese em gel de

agarose 1% em TBE 0,5X a um potencial elétrico de 100V. O gel foi visualizado em transiluminador ultravioleta para confirmar a presença da banda referente ao amplicado.

4.13 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DOS VÍRUS RECOMBINANTES

Para o sequenciamento dos vírus recombinantes, foi utilizado o mesmo DNA extraído no item 4.12, porém feita outra PCR nas mesmas condições já descritas, em um volume final de 50 µL. Após a reação, 20 µL foram utilizados para uma corrida eletroforética e 1 µL para dosagem em *NanoVue Plus Espectrophotometer (GE Healthcare)*. O sequenciamento foi realizado com 400 ng de produto de PCR, 1 uL de iniciador pLW44 (100 uM) (descritos no item 4.8) em um volume total de 7,5 uL. O sequenciamento foi feito pela empresa *MyLeus Biotechnology* e a análise dos dados foram feitas como descrito no item 4.8.

4.14 AMPLIFICAÇÃO VIRAL

Após a conferência pelo sequenciamento, os vírus recombinantes MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI foram amplificados a partir de subsequentes passagens em células BHK-21, partindo de uma placa de cultura de 6 poços para garrafa de cultura celular de 25 cm², para garrafa de 75 cm² e posteriormente para uma garrafa de 150 cm². Os vírus recolhidos na garrafa de 150 cm² foram titulados (item 4.16) e utilizados para infectar 10 garrafas de 150cm² em uma m.o.i de 1.

Em todas as passagens foi realizado o procedimento descrito abaixo. As células foram infectadas com os inóculos virais, como descrito na Tabela 2, a adsorção foi feita a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂, por 1 hora com homogeneização. Após a adsorção foi adicionado mais meio DMEM 5% SFB de acordo com a área da garrafa e esta foi novamente incubada a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5% por 48 horas. Após esse período, as células foram observadas em microscópio de fluorescência e a monocamada foi raspada com o auxílio de *scraper* de células e a suspensão celular foi centrifugada por 15 minutos a 3.500 rpm. O sedimento de células foi ressuspensionado em DMEM 5% SFB, as células foram lisadas em três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido e três ciclos de 30 segundos de sonicação. O sedimento de células obtido nas 10 garrafas de 150 cm² foi congelado a -80°C *overnight* para prosseguir para a purificação.

Tabela 2 – Etapas da amplificação viral e especificações

Etapa	Nº células	Diluição viral	Inóculo viral (mL)	Volume ressuscitado, após infecção (mL)
Placa 6 poços	1×10^6	1/4	0,5	0,5
Garrafa 25 cm ²	3×10^6	1/4	1	1
Garrafa 75 cm ²	1×10^7	1/4	2	2
Garrafa 150 cm ²	2×10^7	1/4	5	1

4.15 PURIFICAÇÃO VIRAL

O sedimentado obtido das 10 garrafas de 150 cm² foi ressuscitado em 8 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em gelo, enquanto o sedimento foi ressuscitado em 10 mL de solução de lise (1 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM KCl) e mantido no gelo por 10 minutos. O sedimento foi homogeneizado em Douncer por 80 manipulações e centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos a 4°C (centrífuga NF 800R, NÜVE). O sobrenadante foi coletado e adicionado ao sobrenadante coletado anteriormente. O mesmo processo de lise foi realizado com o sedimento, porém utilizando 8 mL de tampão de lise. Ao final, o sobrenadante foi adicionado junto aos sobrenadantes coletados anteriormente, resultando em 26 mL de suspensão viral. Essa suspensão foi centrifugada em 10 mL de colchão de sacarose a 36% a 14.000 rpm por 2 horas a 4°C em ultracentrífuga (Thermo Scientific™ Sorvall™ WX 80+). O sobrenadante e a sacarose foram desprezados e o sedimento de partículas virais foi ressuscitado em 1 mL de 10 mM Tris-HCl pH 8,0 e armazenado a -80°C para posterior titulação e uso.

4.16 TITULAÇÃO VIRAL

A titulação viral foi realizada em duplicata de acordo com os seguintes procedimentos. A suspensão viral foi diluída em série em meio DMEM 5%, foi utilizado 500 µL de cada diluição para infectar as monocamadas de células BHK21 (1×10^6 células/poço) em placa de 6 poços. Foi realizado a adsorção a 37°C em 5% de CO₂ por 1 hora. Após este período, o inóculo viral foi retirado e foi adicionado 2 mL de DMEM 5% em cada poço. A placa foi incubada novamente nas mesmas condições por 48 horas. Após esse período, foi feita a contagem de unidades formadoras de foco (UFF) em microscópio de fluorescência. O título

viral, referente ao número de UFF por mL, foi expresso pelo número médio de UFF contadas na diluição que apresentavam entre 30 e 300 UFF, e multiplicado pelo inverso da diluição e pela correção para 1 mL.

4.17 EXTRAÇÃO DE RNA, DETECÇÃO E SEQUÊNCIAMENTO DOS TRANSCRITOS NOS VÍRUS RECOMBINANTES

Para a detecção dos transcritos da proteína multiepitopo HBZ-CHI e HBZp-CHI nos vírus recombinantes amplificados, foi realizada a infecção de monocamadas de células BHK-21. Foi utilizado a mesma metodologia de infecção do item 4.12, porém utilizando uma m.o.i de 1 e incubação por 24 horas. A extração de RNA foi feita utilizando o *TRI Reagent* (*Sigma Aldrich*), foi aplicado 1 mL do reagente diretamente na monocamada de células e foi homogeneizado. A extração foi prosseguida segundo instruções do fabricante. A amostra foi suspendida em 20 uL H₂O livre de nucleases.

Toda a amostra de RNA eluída foi tratada com DNase (*GE Healthcare*). A solução de DNase/buffer foi adicionada às amostras de RNA na proporção v/v de 1/10. A reação foi incubada a 37°C por 10 minutos. Após a reação, foi adicionado 0,1 volume de Acetato de sódio 3M pH:5,2 e 2,5 volumes de etanol 100%. A amostra foi incubada a -20°C por 3 horas. A amostra foi centrifugada a 1600x g por 10 minutos. O sedimento de RNA foi lavado com etanol 70% e foi ressuspendido em 10 uL de H₂O livre de nucleases. Foi feito a dosagem da amostra de RNA em *NanoVue Plus Spectrophotometer* (*GE Healthcare*).

A detecção dos transcritos foi feita por meio da Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa (RT-PCR). A reação foi composta por um *mix* contendo 1500 ng de RNA e 0,5 µg de OligoDT (*IDT – Integrated DNA Technologies*). Esse *mix* foi incubado a 70°C por 5 minutos e depois transferido para banho de gelo. Foi feito outro *mix* contendo 5 µL de M-MLV *buffer* 5x, dNTPs 0,5 mM, 200 U de M-MLV RT (Promega) e H₂O livre de nucleases para um volume final de 25 µL. As duas soluções foram misturadas e submetidas a incubação, 42°C por 60 minutos e 72°C por 15 minutos. Na próxima etapa, foi realizado uma PCR (como descrito no item 4.12) para a amplificação do cDNA, utilizando 200 ng de cDNA e os iniciadores HBZ-CHI *forward* (5' GCT GTG CTT GAC GGT TTG C 3') e *reverse* (5' GTC GTC ATC GTC TTT GTA GTC CC 3'). O par de iniciadores flaqueiam parte da sequência codificadora da proteína multiepitopo em comum as duas sequências desenhadas (HBZ-CHI e HBZp-CHI). As propriedades dos iniciadores estão descritas na Tabela 3. Os iniciadores foram sintetizados pela empresa *IDT Integrated DNA Technologies*. Os produtos da reação de

PCR foram fracionados em eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X a um potencial elétrico de 100V. O gel foi visualizado em transiluminador ultravioleta para confirmar a presença da banda referente ao amplicon.

Tabela 3 – Propriedades dos iniciadores HBZ-CHI

Iniciador	Sequência	Tamanho (bases)	T _m (°C)	CG%	Hairpin	Single Dimer ΔG	Hetero Dimer ΔG
HBZ-CHI <i>Forward</i>	5'GCTGTGCTTGA CGGTTTGC 3'	19	57.8	57.9	-0,09	-3,61	-8,48
HBZ-CHI <i>Reverse</i>	5'GTCGTCATCGTC TTTGTAGTCCC 3'	22	50	56,3	-0,8	-3,61	-8,48

Para o sequenciamento do RNA dos vírus recombinantes, foi utilizado DNA amplificado a partir do cDNA. O sequenciamento foi realizado com 100 ng de produto de PCR, 1 uL de iniciador HBZ-CHI (100 uM) em um volume total de 7,5 uL. O sequenciamento foi feito pela empresa *Myleus Biotechnology* e a análise dos dados foram feitas como descrito no item 4.8.

4.18 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA CELULARES E DETECÇÃO DA PROTEÍNA MULTIEPITOPO POR *WESTERN BLOT*

Para a detecção das proteínas HBZ multiepitopos foram realizados ensaios de *Western Blot*. Monocamadas de células BHK21 (~1 x 10⁶ células/poço) em placas de 6 poços foram infectadas com os vírus recombinantes MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI em m.o.i. de 1 e de 10, de acordo com o item 4.12. Após este momento as monocamadas de células foram lavadas com PBS 1X e raspadas com o auxílio de êmbolo de seringa. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 13000 rpm. Os sedimentos foram suspensos em 80 µL de tampão de amostra de proteína 5X (Tris-HCl 250 Mm pH:6,8, SDS 10%, azul de bromofenol 0,05%, glicerol 40%, 2-mercaptoetanol 10%). A lise celular foi realizada por passagens da amostra em agulha de insulina.

As amostras foram desnaturadas por aquecimento a 95°C por 5 minutos e foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% (SDS-PAGE), com um potencial elétrico de 60 V durante o gel de empilhamento e 100 V no gel de separação.

Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose *Hybond P*. (Amersham ECL Western Blotting – GE Healthcare) através do Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) por 1 hora a uma corrente elétrica de 100V. Foi realizado o bloqueio com tampão de bloqueio (5% (p/v) de leite desnatado em pó em TBS 1X (50 mM Tris-HCl pH 7,5 e 150 mM NaCl)) *overnight* a 4°C. Foi feita a lavagem das membranas com TTBS 1X (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl e Tween-20 a 0,1%) por três vezes, durante 5 minutos cada. Foram utilizados anticorpos monoclonais anti-FLAG (F3165, SIGMA), na diluição de 1:1000, e soro de pacientes HTLV positivos e negativos, na diluição de 1/50 e 1/100, estes foram incubados com a membrana *overnight*, a 4°C. Após este período, as membranas foram lavadas com TTBS 1X por três vezes de cinco minutos. Foi adicionado às membranas os anticorpos secundários, anti-mouse IgG peroxidase (WB7539, Novusbio) (1/3000) para a membrana marcada com FLAG e anti-human IgG peroxidase (SIGMA) (1/1000), com um tempo de incubação de 2 horas. Novamente, as membranas foram lavadas três vezes com TTBS 1X. As membranas foram reveladas utilizando-se o Kit *ECLTM Plus Western Blotting Detection System* (GE Healthcare) e o filme *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare), segundo instruções do fabricante. Foi também realizado a revelação da membrana através da precipitação com uma solução de 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) e 4-chloro-1-naphthol (4CN). Os soros utilizados nestes experimentos são parte integrante da coorte GIPH. O uso deste material biológico foi aprovado na UFMG (CAAE - 55618516100005149) e na Fundação HEMOMINAS (CAAE - 55618516130015118).

5 RESULTADOS

5.1 PREDIÇÃO DE EPITOPOS E CONTRUÇÃO DAS SEQUÊNCIAS MULTIEPITOPOS

Através da revisão da literatura, foi possível identificar dois peptídeos da proteína HBZ que são imunogênicos e capazes de induzir resposta citotóxica contra a proteína HBZ do HTLV-1. Os peptídeos selecionados para compor a proteína multiepitopo foram, ₄₂AVLDGLLSL₅₀ (MACNAMARA et al. 2010) e ₁₅₇QELGIDGYTRQLEGEVESLE₁₇₆ (SUGATA et al. 2015). Através da análise *in silico* foi possível identificar outros três peptídeos para compor a proteína. Na predição pelo programa NetMHCpan 4.0 e utilizando a sequência completa de HBZ (ABB89742.1), foram preditos os dois epitopos já descritos acima, mais outros três peptídeos, listados na Tabela 4. Nesta tabela, estão listados os seis epitopos que ficaram dentro dos dois *thresholds* definidos, quanto mais próximo de 0 em Rank% significa que o peptídeo tem maior afinidade de ligação com HLA-A*02, haplótipo associado com proteção (MACNAMARA et al. 2010).

Tabela 4 – Epitopos identificados pela ferramenta *NetMHCpan 4.0*

Posição (aa)	Sequência	Rank %	Força de ligação
42 - 50	AVLDGLLSL	0,0899	forte
26 -34	GLLSLEEEL	0,1074	forte
22 - 30	ELVDGLLSL	0,2310	forte
18 - 27	LLVEELVDGL	0,5627	fraca
160 - 168	GIDGYTRQL	1,3404	fraca
167 - 175	QLEGEVESL	1,3511	fraca

Na ferramenta NetCTL 1.2 foram identificados quatro epitopos, listados na Tabela 5. Os quatro epitopos listados foram identificados como ligantes de MHC supertipo A2 (supertipo ao qual o HLA-A*02 se enquadra) e foram classificados a partir da pontuação, sendo a maior pontuação o epitopo de maior afinidade.

Tabela 5 – Epitopos identificados pela ferramenta *NetCTL 1.2*

Posição (aa)	Sequência	Pontuação
42 - 50	AVLDGLLSL	1,2134
26 -34	GLLSLEEEL	1,0735
22 - 30	ELVDGLLSL	0,9524
167 - 175	QLEGEVESL	0,7752

Na ferramenta *IEDB – MHC-I Binding Predictions* foram identificados cinco epitopos, listados na Tabela 6. Foram identificados por esta ferramenta cinco epitopos, já listados nas ferramentas anteriores, com um baixo valor de Rank %, como no NetMHCpan 4.0.

Tabela 6 – Epitopos identificados pela ferramenta *IEDB – MHC-I Binding Predictions*

Posição (aa)	Sequência	Rank %
26 -34	GLLSLEEEL	0,8
18 - 27	LLVEELVDGL	1,1
42 -50	AVLDGLLSL	1,6
164 - 175	YTRQLEGEVESL	3.2
22 - 30	ELVDGLLSL	3.3

Os cinco epítopos preditos pelo NetMHCpan 4.0, foram também indicados por uma ou por duas ferramentas. Então, os peptídeos escolhidos para compor a proteína quimérica para a geração da potencial vacina terapêutica foram: HBZ₄₂₋₅₀, HBZ₁₅₇₋₁₇₆, HBZ₂₆₋₃₄, HBZ₂₂₋₃₀, HBZ₁₈₋₂₇. A Tabela 7, indica os epítopos selecionados e por qual das ferramentas este foi identificado, marcado por “X”. Quatro dos epítopos selecionados (HBZ₄₂₋₅₀, BZ₂₆₋₃₄, HBZ₂₂₋₃₀, HBZ₁₈₋₂₇), estão localizados no domínio ativador da proteína, enquanto o epítopo HBZ₁₅₇₋₁₇₆ está localizado no domínio bzip da proteína (Figura 16). Cada domínio é capaz de interagir com diversas moléculas celulares, como fatores de transcrição, proteínas da via NF-κB e da família Jun, que desencadeiam diferentes repostas.

Tabela 7 – Epítomos selecionados para compor a proteína multiepitopo e como foram identificados

Identificação	Posição (aa)	Sequência	Revisão Literatura	NetMHCpan	NetCTL	IEDB
Pep1	42 - 50	AVLDGLLSL	X	X	X	X
Pep2	26 -34	GLLSLEEEEL		X	X	X
Pep4	22 - 30	ELVDGLLSL		X	X	X
Pep3	18 - 27	LLVEELVDGL		X		X
Pep5	157-176	QELGIDGYTRQLEGEVESLE	X	X	X	X

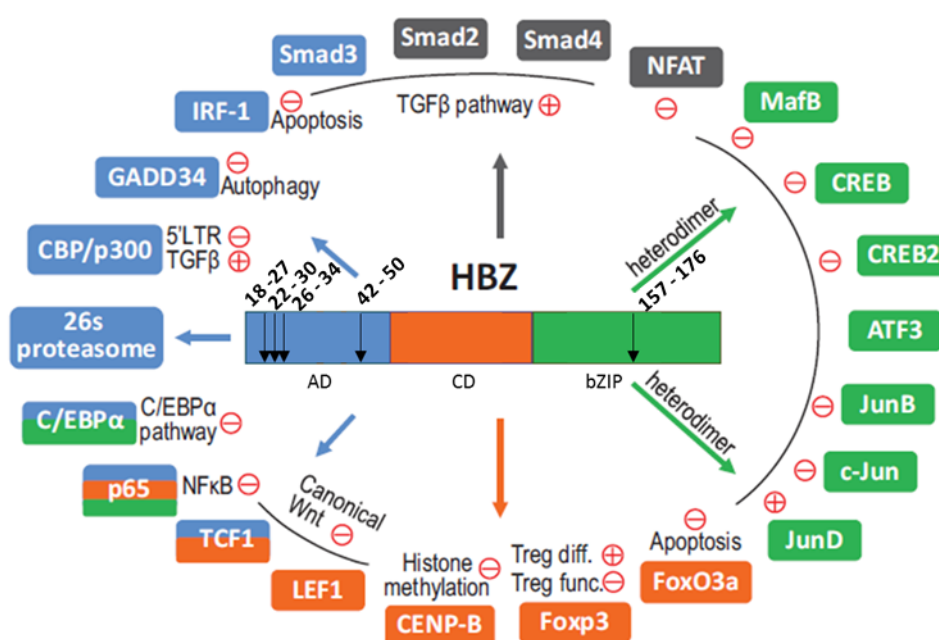


Figura 16 – Epítomos selecionados indicados no interatoma da proteína HBZ. As setas pretas na proteína HBZ indicam onde está localizado os epítomos selecionados. Os três domínios da proteína HBZ estão destacados pelas diferentes cores, enquanto as proteínas celulares que interagem com a HBZ estão demonstradas nos quadrados destacados com as cores corresponde aos domínios de interação, AD, CD ou bZIP. Proteínas celulares que interagem com mais de um domínio é representada com mais de uma cor, já as proteínas coloridas de cinza, indica a falta dessa informação. Os sinais de positivos e negativos indicam o impacto (positivo ou negativo) das vias através da interação com HBZ. Fonte: MA; YASUNAGA; MATSUOKA, 2016 (adaptado).

Sendo assim, foi feito o desenho da sequência multiepitopo, adicionando-se também, os espaçadores GSGSG, a etiqueta FLAG, sequências de terminação de transcrição e tradução, e de clonagem. Foi adicionado também em uma das sequências o peptídeo sinal tPA. O desenho das sequências foi feito através do programa *SnapGene* 4.1.4 (Figura 17). As sequências desenhadas foram sintetizadas e clonadas em pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp, os mapas dos vetores com os insertos HBZ-CHI e HBZp-CHI estão indicados na Figura 18.

Figura 17 – Sequências nucleotídicas e de aminoácidos das sequências codificadora das proteínas multiepitopo. A) Sequência HBZ-CHI. B) Sequência HBZp-CHI. Pep1 se refere à HBZ₄₂₋₅₀, Pep2 à HBZ₂₆₋₃₄, Pep3 à HBZ₁₈₋₂₇, Pep4 à HBZ₂₂₋₃₀ e Pep5 à HBZ₁₅₇₋₁₇₆.

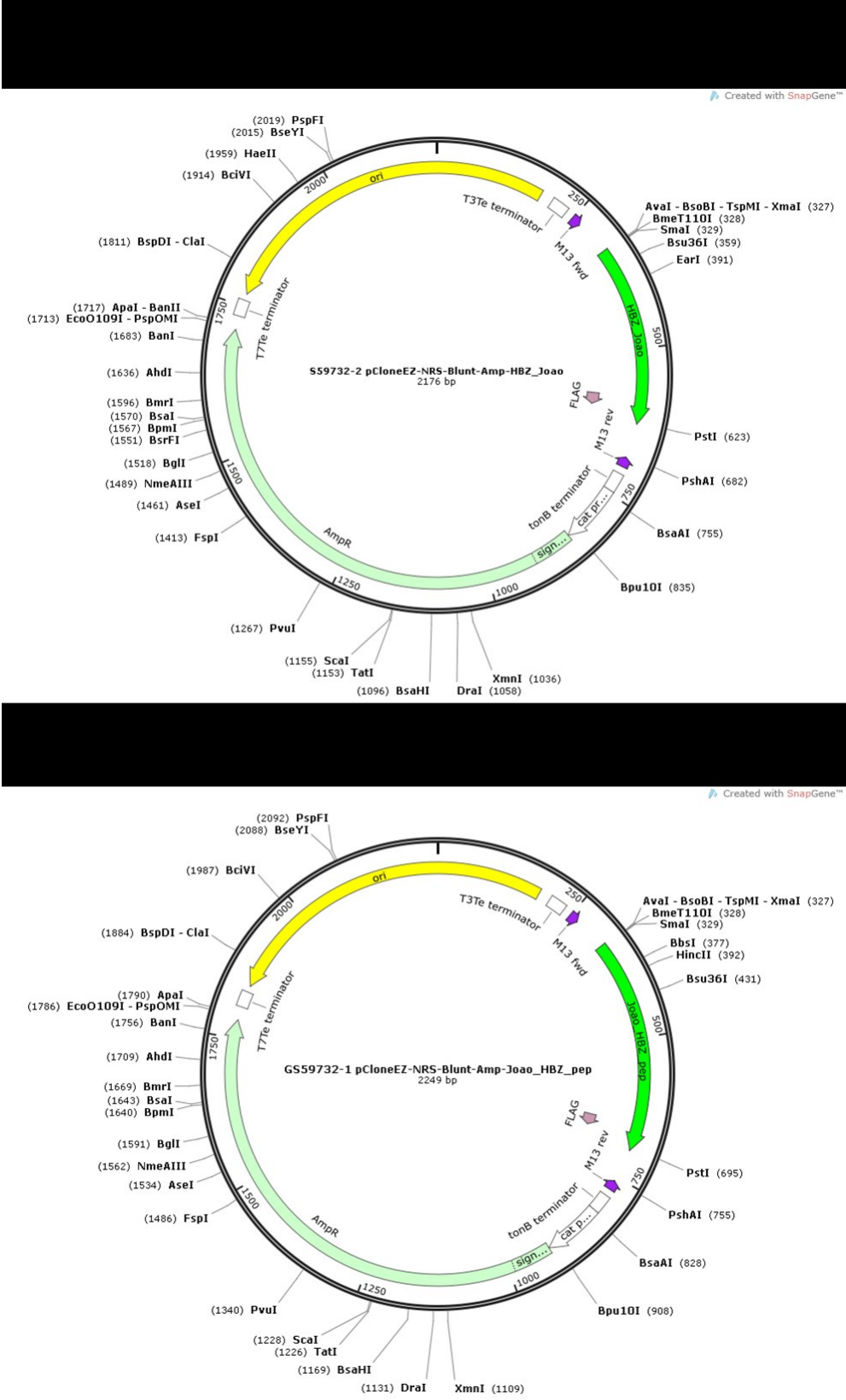


Figura 18 – Mapa do vetor pCloneEZ-NRS-Blunt-Amp. A) Vetor clonado com HBZ-CHI. B) Vetor clonado com HBZp-CHI. O vetor apresenta uma sequência de origem de replicação, um gene de resistência a ampicilina, sítios múltiplos de clonagem e as sequências de interesse.

A eficiência do peptídeo sinal tPA, adicionado a sequência HBZp-CHI, foi verificado pela ferramenta *SignalP* 4.1. Segundo o gráfico gerado pela ferramenta, o tPA foi identificado como peptídeo sinal, havendo um ponto de clivagem da proteína logo após o peptídeo sinal, entre os aminoácidos 25 e 26. O gráfico gerado pode ser observado na Figura 19.

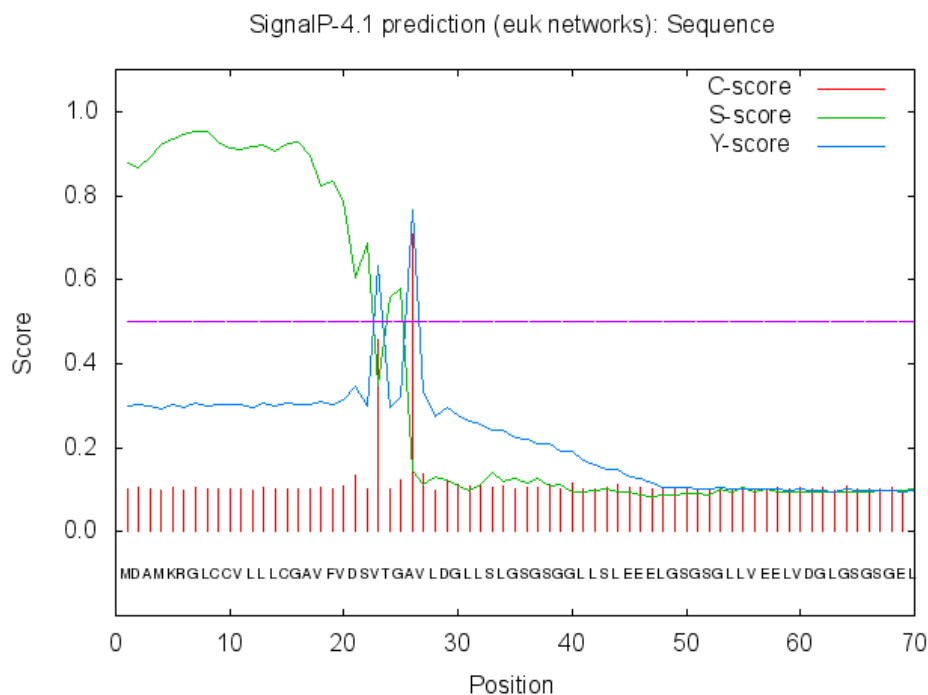


Figura 19 – Gráfico gerado pelo *SignalP* 4.1. Este gráfico possui em seus eixos x e y, a posição de aminoácidos e o *score*, respectivamente. Este gráfico indica a localização do peptídeo sinal e o sítio de clivagem. O *C-score* indica a posição do sítio de clivagem. O *S-score* indica a porção com peptídeo sinal e a porção sem peptídeo sinal. O *Y-score* é a combinação (média geométrica) do *C-score* e *S-score* e indica uma melhor predição do sítio de clivagem. No *Y-score* o maior pico indica o sítio de clivagem.

5.2 OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS pCLONEEZ (HBZ-CHI e HBZp-CHI)

Para a expansão dos plasmídeos pCloneEZ (HBZ-CHI e HBZp-CHI) foi necessário gerar bactérias *E. coli* quimiocompetentes. No teste de competência, foram obtidos 1×10^6 cfu/ μ g-plasmídeo, estas bactérias foram usadas em todos os processos de transformação bacteriana. Foram selecionadas duas colônias de cada plasmídeo para realizar a restrição. Após a extração de DNA plasmideal das bactérias transformadas com os plasmídeos pCloneEZ, foi realizado a restrição enzimática com as enzimas *Sma*I e *Pst* para a confirmação da presença dos insertos (Figura 20). Foi realizado também a restrição do plasmídeo pLW44 para subsequente subclonagem.

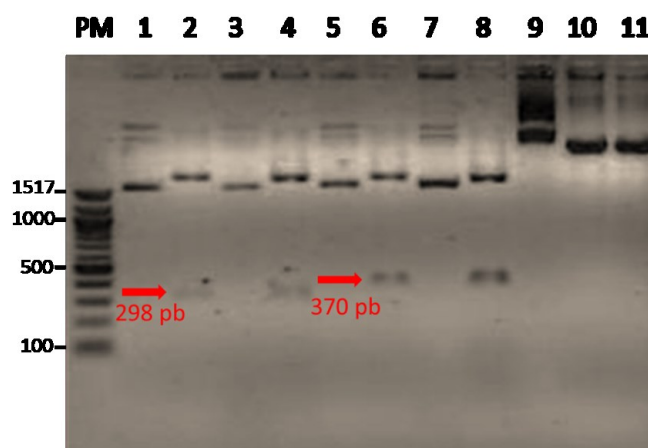


Figura 20 – Restrição dos plasmídeos pCloneEZ-HBZ-CHI e pCloneEZ-HBZp-CHI pelas enzimas SmaI e PstI. Fracionamento dos produtos das reações enzimáticas com SmaI e PstI em gel de agarose 1% e TBE 0,5X. **PM:** Padrão de peso molecular 100pb. **1,3:** Plasmídeos pCloneEZ-HBZ-CHI não digeridos. **2,4:** Plasmídeos pCloneEZ-HBZ-CHI digeridos. **5,7:** Plasmídeos pCloneEZ-HBZp-CHI não digeridos. **6,8:** Plasmídeos pCloneEZ-HBZp-CHI digeridos. **9:** Plasmídeo pLW44 não digerido. **10,11:** Plasmídeos pLW44 digeridos. A seta à esquerda aponta fragmentos de 298 pb, relativos ao produto do clone HBZ-CHI e a seta à direita aponta fragmentos de 370 pb relativos ao produto do clone HBZp-CHI.

O produto da restrição dos plasmídeos pCloneEZ deveria conter duas bandas, uma referente ao vetor linear de 1878pb e outra de 298pb para HBZ-CHI ou 370pb para HBZp-CHI. O perfil de restrição das amostras na Figura 20 confirma a presença dos insertos HBZ-CHI e HBZp-CHI nos plasmídeos pCloneEZ. Para a subclonagem, as bandas dos insertos HBZ-CHI e HBZp-CHI, e do pLW44 linear foram sujeitas à ligação e transformação bacteriana. Foram selecionadas duas colônias de cada plasmídeo para confirmar o sucesso da ligação. Foi realizado a mesma restrição, com SmaI e PstI, dos plasmídeos pLW44 (Figura 21).

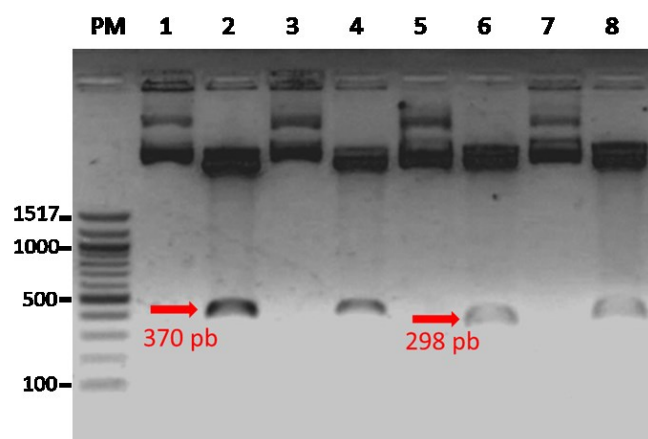


Figura 21 – Restrição dos plasmídeos pLW44-HBZ-CHI e pLW44-HBZp-CHI pelas enzimas SmaI e PstI. Fracionamento dos produtos das reações enzimáticas com SmaI e PstI em gel de agarose 1% e TBE 0,5X. **PM:** Padrão de peso molecular 100pb. **1,3:** Plasmídeos pLW44-HBZp-CHI não digeridos. **2,4:** Plasmídeos pLW44-HBZp-CHI digeridos. **5,7:** Plasmídeos pLW44-HBZ-CHI não digeridos. **6,8:** Plasmídeos pLW44-HBZ-CHI digeridos. A seta à esquerda aponta fragmentos de 370 pb, relativos ao produto do clone HBZp-CHI e a seta à direita aponta fragmentos de 298 pb relativos ao produto do clone HBZ-CHI.

Caso houvesse inserto no vetor, na janela de leitura correta, era esperado a presença de duas bandas; uma banda referente ao vetor, de 5028 pb e outra de 298pb para HBZ-CHI ou 370 para HBZp-CHI. O perfil de restrição confirma então o sucesso da subclonagem dos insertos no pLW44, estes foram submetidos ao sequenciamento genético.

5.3 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DOS PLASMÍDEOS

Uma amostra de cada um dos plasmídeos gerados foi submetida ao sequenciamento genético. Este foi realizado para verificar a correta inserção dos genes e se houve alguma alteração nucleotídica durante o processo de subclonagem. Além da sequência do gene clonado, foi possível também verificar a sequência do promotor. As sequências de nucleotídeos apresentaram 100% de identidade com as sequências desenhadas. O alinhamento das sequências sequenciadas com as desenhadas está representado nas Figuras 22 e 23.

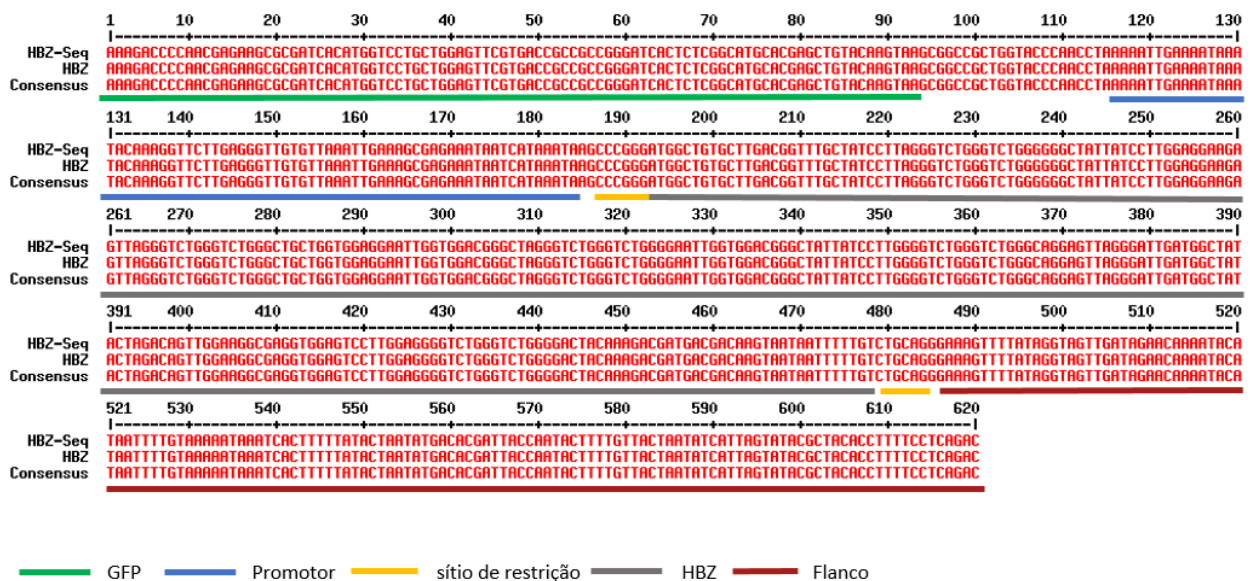


Figura 22 - Alinhamento do sequenciamento do plasmídeo pLW44-HBZ-CHI pelo *Multalin*. A sequência HBZ-Seq representa o sequenciamento e HBZ representa o desenho do gene clonado. As linhas marcadas abaixo do sequenciamento indicam a região do plasmídeo sequenciado de acordo com cada cor.

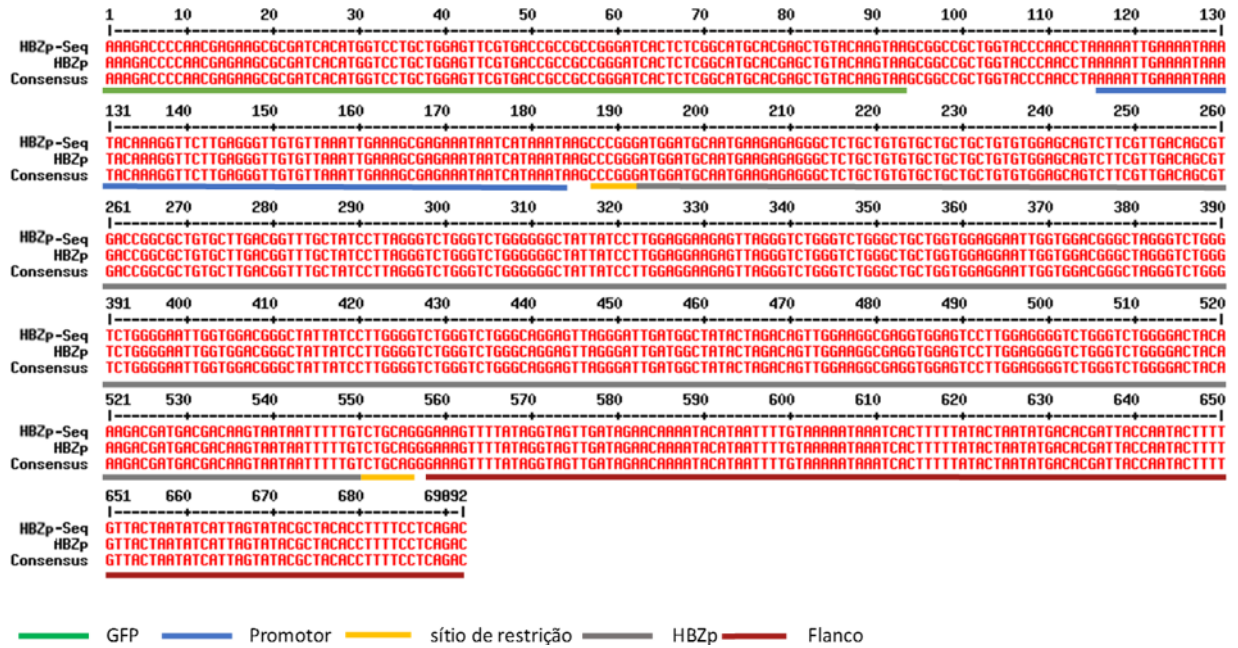


Figura 23 - Alinhamento do sequenciamento do plasmídeo pLW44-HBZp-CHI gerado pelo *Multalin*. A sequência HBZp-Seq representa o sequenciamento e HBZp representa o desenho do gene clonado. As linhas marcadas abaixo do sequenciamento indicam a região do plasmídeo sequenciado de acordo com cada cor.

5.4 GERAÇÃO DE VÍRUS RECOMBINANTES E SELEÇÃO DE CLONES

Através dos plasmídeos de transferência pLW44-HBZ-CHI e pLW44-HBZp-CHI, foram gerados os vírus recombinantes MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI, por meio de recombinação homóloga em células CEF em ensaio de infecção/transfecção. A recombinação foi confirmada pela expressão da proteína GFP, visualizada em microscopia de fluorescência após 48 horas (Figura 24).

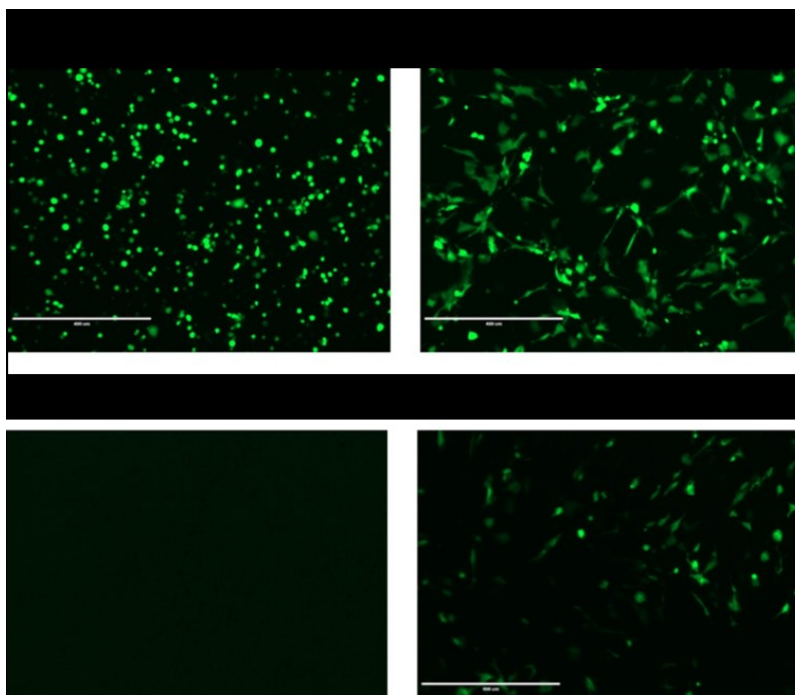


Figura 24 – Microscopia de fluorescência da geração dos MVA recombinantes em células CEF. Foto capturada após 48 horas do ensaio transfecção/infecção. C+: Controle positivo, células transfectadas com plasmídeos pLW44 C-: Controle de células (CEF não transfectadas). A barra branca representa 400 μ m. Foto obtida pelo microscópio de fluorescência *EVOS® FL Cell Imaging System, Thermo Fisher* no aumento de 400x.

Após a geração dos vírus, estes foram selecionados através de subsequentes passagens celulares e seleções de placas de foco. Foram realizadas sete (7) passagens para selecionar os vírus MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI. A cada passagem de seleção foi observado o aumento da placa de foco formada e a eliminação de vírus selvagem. As rodadas de seleções de clones recombinantes estão presentes na Figura 25, com exceção da segunda rodada, pois não houve registro.

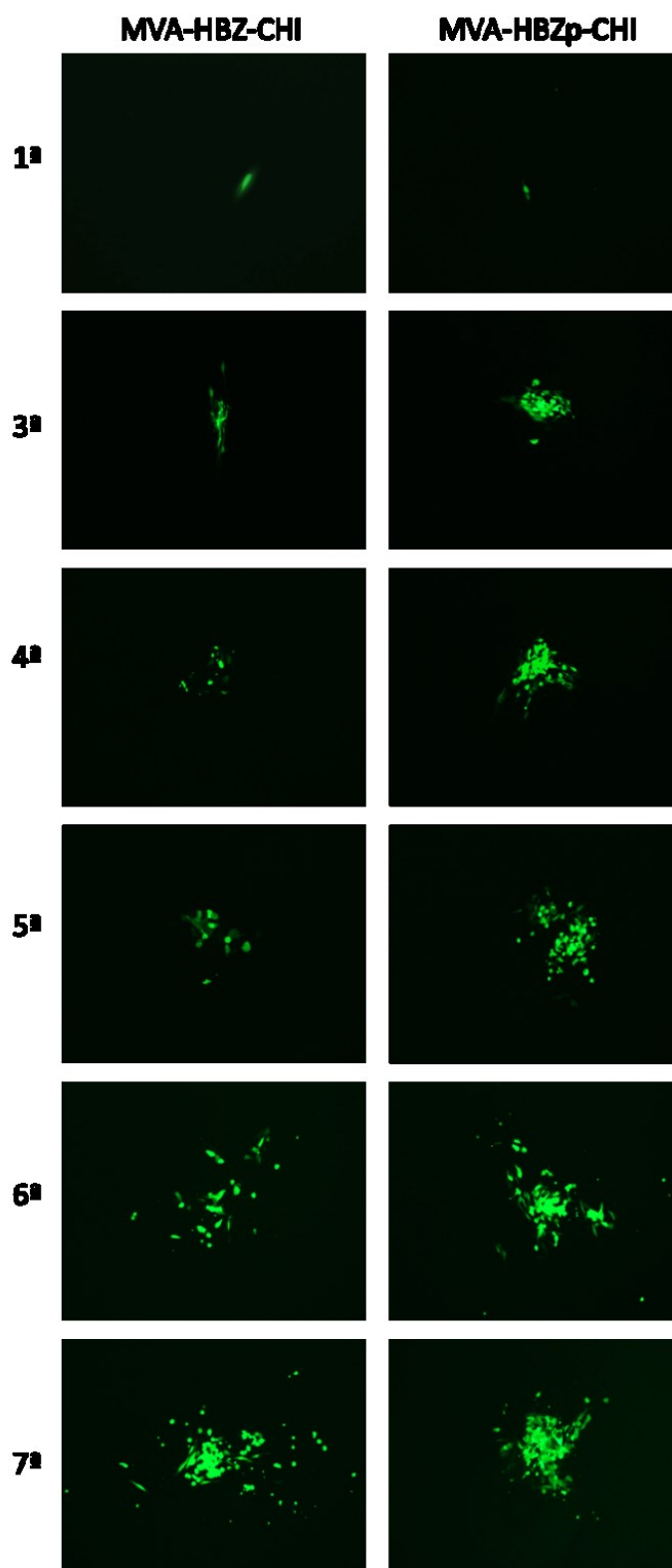


Figura 25 – Rodadas de seleções dos vírus recombinantes MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI. Fotografia tirada por microscopia de fluorescência após 48 horas de infecção. As colunas são referentes as amostras virais, enquanto as linhas são referentes as rodadas de seleções. Foto obtida pelo microscópio de fluorescência *EVOS® FL Cell Imaging System, Thermo Fisher* no aumento de 400x.

5.5 DETECÇÃO DO INSERTO DE INTERESSE NOS VÍRUS RECOMBINANTES

Para realizar a PCR para a identificação dos insertos no vírus recombinantes selecionados, foi necessário padronizar a reação utilizando o plasmídeo pLW44-HBZ em diferentes condições de temperatura de anelamento dos iniciadores pLW44 *forward* e *reverse*, foi através desta reação também que se determinou a concentração de cada componente da reação, como descrito na metodologia (item 4.12) (Figura 26).

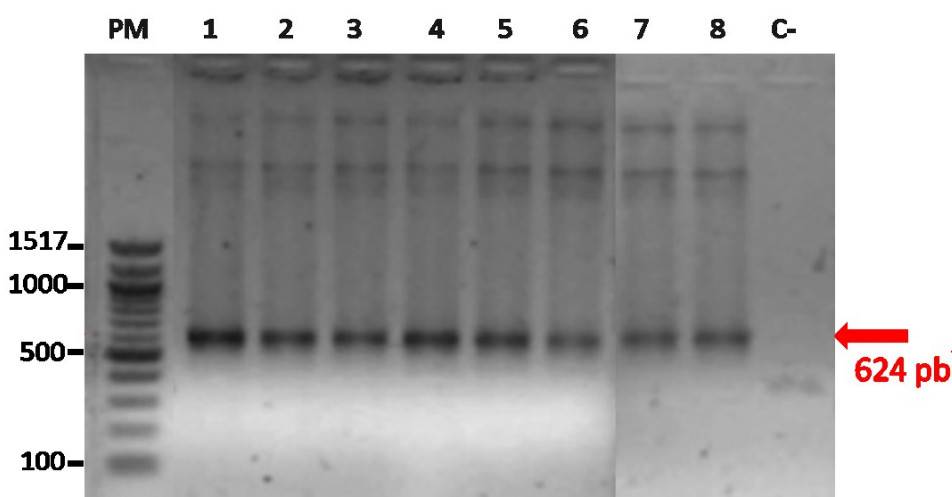


Figura 26 – Padronização da reação de PCR com plasmídeos pLW44-HBZ-CHI em diferentes temperaturas de anelamento. Fotografia do gel de agarose 1% e TBE 0,5X. **PM:** Padrão de peso molecular (100pb). **1:** 61°C. **2:** 60,5°C. **3:** 59,6°C. **4:** 58,3°C. **5:** 56,7°C. **6:** 55,3°C. **7:** 54,5°C. **8:** 54,0°C **C-:** Controle negativo, sem adição de plasmídeo. A seta à esquerda aponta fragmentos de 624 pb, relativos ao produto da PCR do plasmídeo pLW44-HBZ-CHI.

Na PCR com o par de iniciadores pLW44 com a sequência HBZ-CHI, era esperado a amplificação de um fragmento de 624pb, o que foi confirmado na corrida eletroforética da figura acima. De acordo com análise dos amplicons acima, foi estabelecido que a temperatura de anelamento de 61°C amplificou o DNA mais eficientemente. Esta temperatura foi então utilizada para detectar os insertos no DNA viral. A reação com plasmídeos foi utilizada como controle positivo da reação do DNA viral.

Para a detecção dos insertos HBZ-CHI e HBZp-CHI, dois (2) clones de cada um dos vírus selecionados na sétima passagem das rodadas de seleções foram amplificados em placa de seis (6) poços de células CEF para a extração do DNA. A presença dos insertos nos vírus recombinantes foi confirmada por PCR. A reação foi também feita a partir do DNA do controle de células e de células infectadas com o vírus MVA selvagem, como controles negativos. O resultado da reação pode ser observado na Figura 27.

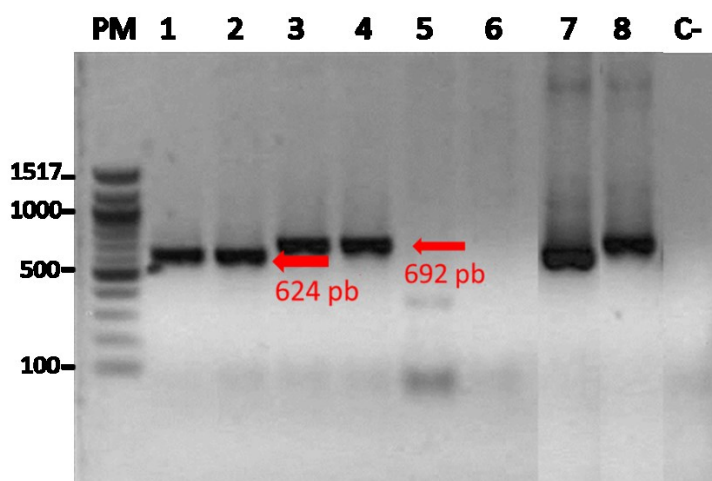


Figura 27 - Confirmação dos insertos HBZ-CHI e HBZp-CHI no DNA dos vírus MVA recombinantes por PCR. Fotografia da corrida em gel de agarose 1% e TBE 0,5X. PM: Padrão de peso molecular (100pb) 1: MVA-HBZ-CHI cl.1. 2: MVA-HBZ-CHI cl.2. 3: MVA-HBZp-CHI cl.1. 4: MVA-HBZp-CHI cl.2. 5: Células CEFs infectadas com MVA selvagem. 6: Controle de células CEFs. 7: Controle positivo (pLW44- HBZ-CHI). 8: controle positivo (pLW44-HBZp-CHI). C-: controle negativo (reação sem DNA). A seta à esquerda aponta fragmentos de 624 pb, relativos ao produto da PCR do clone MVA-HBZ-CHI e a seta à direita aponta fragmentos de 692 pb relativos ao produto da PCR do clone MVA-HBZp-CHI.

Na PCR com o par de iniciadores pLW44 e utilizando como molde o DNA dos vírus MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI, era esperada a amplificação de fragmentos de 624pb e 692pb, respectivamente. Essa PCR confirma a presença dos insertos nos vírus recombinantes. O fragmento da amplificação dos vírus apresenta o mesmo perfil dos fragmentos dos plasmídeos pLW44, usados como controle positivo neste experimento. Observa-se também a ausência de amplificação de fragmentos de DNA nos controles de vírus e células, como esperado, o que confirma que a amplificação observada nas amostras não é de origem celular ou do vetor viral. Este resultado confirma o sucesso da recombinação homóloga e a presença dos cassetes gênicos HBZ-CHI e HBZp-CHI nos respectivos vírus recombinantes.

5.6 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO DOS VÍRUS RECOMBINANTES

Uma vez confirmado a presença dos insertos HBZ-CHI e HBZp-CHI nos vírus recombinantes. Foi realizado o sequenciamento do DNA viral, para verificar a sequência de nucleotídeos dos vírus recombinantes está de acordo com a sequência sintetizada. O sequenciamento foi feito a partir do produto da PCR do DNA viral com os iniciadores pLW44. Dos dois clones selecionados de cada vírus, apenas o “clone 1” foi sequenciado. O alinhamento das sequências está apresentado na Figura 28.

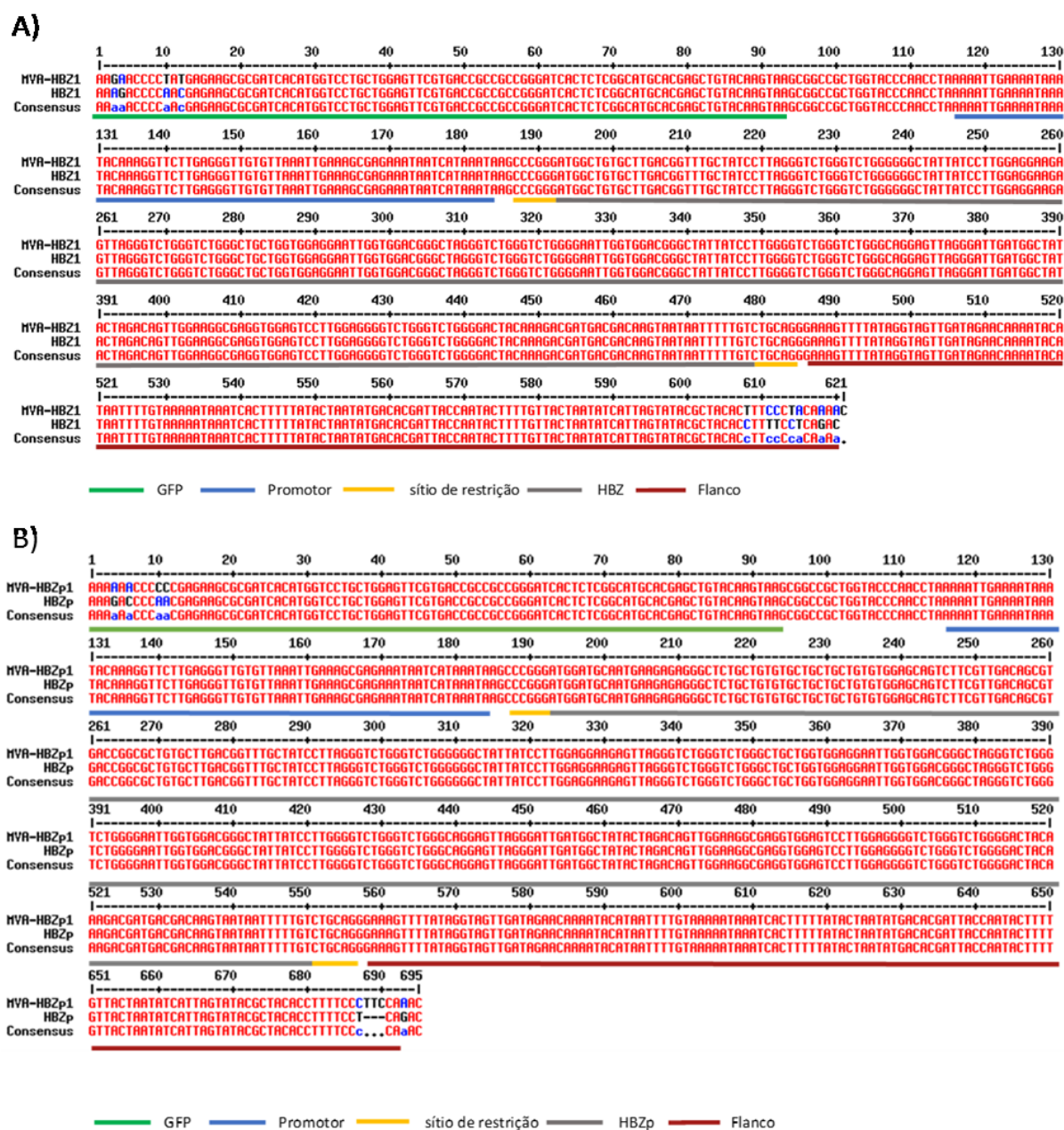


Figura 28 - Alinhamento do sequenciamento dos vírus recombinantes MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI gerado pelo *Mutalin*. A) O alinhamento é referente ao vírus MVA-HBZ-CHI; MVA-HBZ1 representa o sequenciamento e HBZ1 representa o desenho do gene clonado. B) O alinhamento é referente ao vírus MVA-HBZp-CHI; MVA-HBZp1 representa o sequenciamento e HBZp representa o desenho do gene clonado. As linhas marcadas abaixo do sequenciamento indicam a região do plasmídeo sequenciado de acordo com cada cor.

As duas sequências codificadoras HBZ-CHI e HBZp-CHI apresentaram 100% de identidade com a sequência desenhada. Não havendo mutações nos genes multiepitopos. As extremidades dos sequenciamentos apresentaram alguns erros, mas este é devido à baixa qualidade do sequenciamento nas extremidades. Foi verificado pelo sequenciamento a correta construção dos vírus MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI.

5.7 AMPLIFICAÇÃO E TITULAÇÃO VIRAL

Após a confirmação do sequenciamento dos vírus, estes foram amplificados, com a finalidade de se obter altos títulos virais. A amplificação foi feita através de passagens subsequentes dos vírus em células BHK-21. Os vírus foram passados em células em placa de 6 poços, garrafa de cultura celular de 25 cm², 75 cm², 150 cm² e por último em 10 garrafas de 150 cm² em uma m.o.i de 1 (Figura 29).

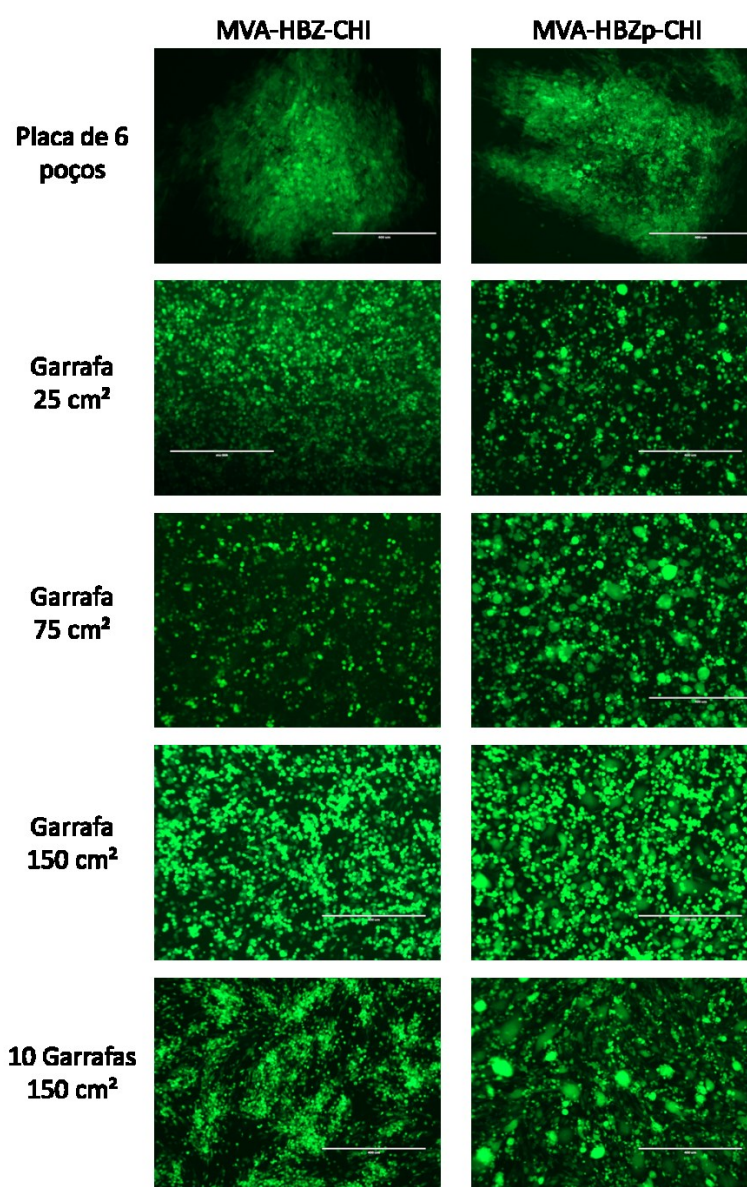


Figura 29 – Amplificação dos vírus recombinantes MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI em células BHK-21. Fotografia tirada por microscopia de fluorescência após 48 horas de infecção. As colunas são referentes as amostras virais, enquanto as linhas são referentes as etapas de amplificação. A barra branca representa 400 μm. Foto obtida pelo microscópio de fluorescência *EVOS® FL Cell Imaging System, Thermo Fisher* no aumento de 400x.

Em todas as etapas da amplificação viral foi observado um “tapete verde” indicando que a maioria das células estão infectas. Os vírus amplificados nas 10 garrafas 150 cm² foram então purificados em colchão de sacarose 36% e titulados através de diluições seriadas e contagem de uff. Foram obtidos os títulos de $1,2 \times 10^9$ uff/mL e $9,7 \times 10^9$ uff/mL para os vírus MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI, respectivamente.

5.8 DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS HBZ A PARTIR DE VÍRUS MVA RECOMBINANTES

5.8.1 Detecção e sequenciamento de transcritos por RT-PCR

Foi realizado a transcrição reversa com o propósito de se confirmar a expressão do mRNA codificador das proteínas recombinantes, nos vetores MVA. Foi realizado a PCR do cDNA obtido a partir transcrição reversa do RNA extraído de 1×10^6 células infectadas com os MVAs recombinantes. Os produtos foram fracionados em eletroforese de agarose 1% em TBE 0,5X (Figura 30).

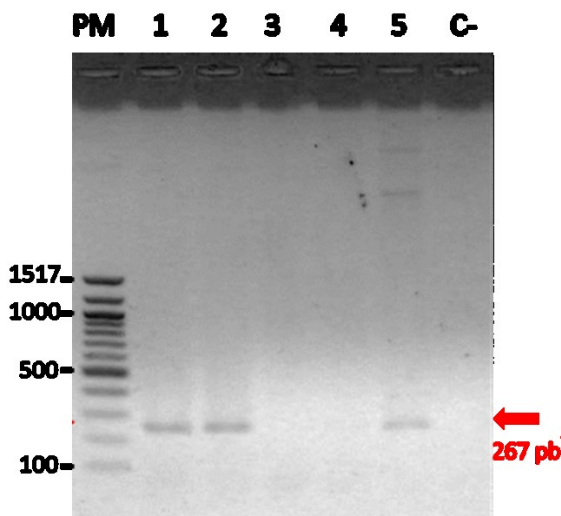


Figura 30 – Confirmação dos transcritos, HBZ-CHI e HBZp-CHI, por RT-PCR. Fotografia da corrida em gel de agarose 1% e TBE 0,5X. **PM:** Padrão de peso molecular (100pb). **1:** MVA-HBZ-CHI. **2:** MVA-HBZp-CHI. **3:** Células infectadas com vírus selvagens **4:** Controle de células **5:** Controle positivo (plasmídeo pLW44-HBZ-CHI). **C-:** controle negativo (reação sem cDNA). A seta à esquerda aponta fragmentos de 267 pb, relativos ao produto da PCR do cDNA dos transcritos HBZ.

O par de iniciadores HBZ-CHI *forward* e *reverse* se anelam às regiões codificadoras em comum aos genes HBZ-CHI e HBZp-CHI, amplificando 267pb. A Figura 30 confirma então a amplificação do cDNA do vírus MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI, de acordo com o controle plasmideal testado. Pode se observar também a ausência de bandas nas canaletas

O *Western blot* foi utilizado para detectar a expressão das proteínas recombinantes HBZ-CHI e HBZp-CHI pelos respectivos vírus recombinantes. O *Western blot* foi feito utilizando-se proteínas extraídas de células BHK-2, infectadas com vírus recombinantes em m.o.i de 1 e de 10, controles de vírus e de células. As membranas foram incubadas com anticorpos Anti-FLAG, soro de pacientes HTLV-1 positivos e soro de pacientes HTLV-1 negativos, provenientes da coorte GIPH. Duas formas de revelação foram utilizadas, por ECL

(quimioluminescência) e por DAB (3, 3'-diaminobenzidina). Era esperado a detecção das proteínas HBZ-CHI e HBZp-CHI de tamanho aproximado de 9,01 kDa. Apesar das tentativas com diferentes m.o.i, extratos de proteínas, anticorpos e métodos de revelação, não foi possível detectar a expressão das proteínas recombinantes por *Western blot*. Quando a membrana foi incubada com o anticorpo monoclonal comercial anti-FLAG foi observada uma banda do tamanho esperado, porém também estavam presentes no controle, além da presença de outras bandas inespecíficas. O mesmo foi observado ao se utilizar soros de pacientes. Não houve diferenciação de perfil de bandas entre as células infectadas com vírus recombinantes e controles, assim como não houve diferença significativa entre as membranas incubadas com soros de pacientes positivos e negativos. Houve também a presença de bandas inespecíficas (Figura 31).

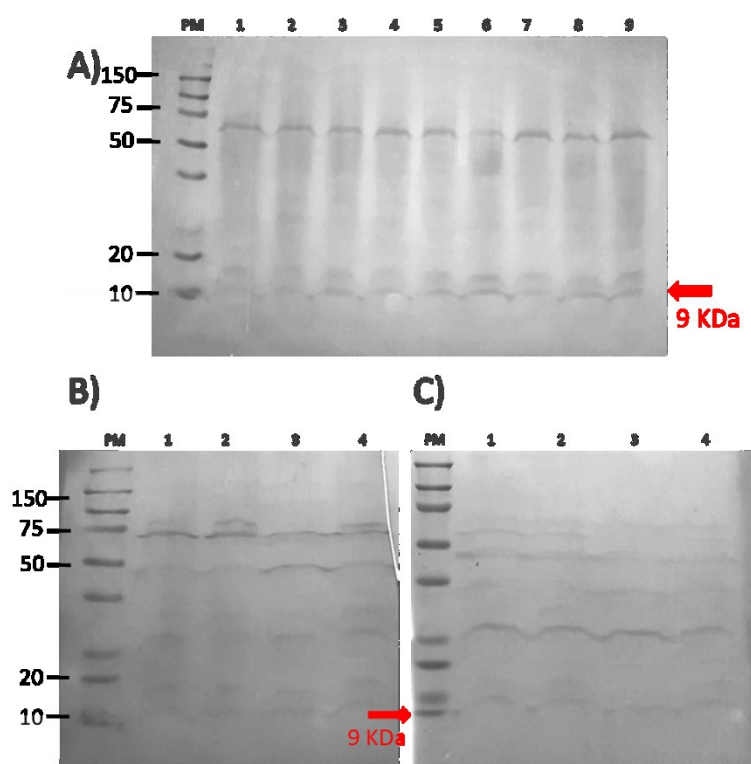


Figura 32 – Teste para detecção das proteínas recombinantes por *Western blot*. As amostras são extratos proteicos de células BHK-21 infectadas, as membranas foram reveladas por DAB. **A)** Membrana incubada com anticorpos Anti-FLAG. **PM:** Padrão de peso molecular (Kaleidoscope™ – Bio-Rad) **1:** MVA-HBZ-CHI, m.o.i: 1, **2:** MVA-HBZ-CHI, m.o.i: 10, **3:** MVA-HBZp-CHI, m.o.i: 1, **4:** MVA-HBZp-CHI, m.o.i: 10, **5:** MVA selvagem, **6:** Controle de células, **7, 8, 9:** Controle positivo de FLAG (50KDa). **B)** Membrana incubada com soro de pacientes negativos para HTLV-1. **C)** Membrana incubada com soro de pacientes positivos para HTLV-1. As membranas B e C apresentam a seguinte ordem de amostras: **1:** MVA-HBZp-CHI, m.o.i: 10, **2:** MVA-HBZp-CHI, m.o.i: 10, **3:** MVA selvagem, **4:** Controle negativo (MVA recombinante). As setas apontam o tamanho de peso molecular esperado das proteínas recombinantes de KDa.

5.8.3 *Análise da morfologia das células infectadas*

Apesar de não ter sido possível detectar a expressão das proteínas recombinantes nas células infectadas pelos vírus MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI por *Western blot*, foi possível amplificar o DNA do tamanho esperado a partir do RNA transcrito em células infectadas com os vírus recombinantes, o que não se deu nas células infectadas com o vírus selvagem (5.8.1). Outro fator que contribui para confirmar a expressão das proteínas é a morfologia das células infectadas por vírus das distintas construções. Como esperado, as células infectadas pelos vírus recombinantes apresentam efeitos citopáticos quando comparado ao controle de células. Porém, os dois vírus recombinantes apresentam efeitos citopáticos distintos, sendo que a única diferença entre eles, é a presença do peptídeo sinal na proteína recombinante HBZp-CHI. As células infectadas com MVA-HBZ-CHI apenas apresentam arredondamento das células, enquanto as infectadas com MVA-HBZp-CHI apresentam arredondamento, aumento do número de projeções citoplasmáticas (asterisco) e a formação de sincício (setas vermelhas) (Figura 32). Pode-se dizer então que a proteína recombinante contendo o peptídeo sinal de alguma forma induz a formação de sincícios nas células, sendo que é a única diferença entre as células infectadas. Desta forma, pode se induzir que as proteínas recombinantes estão sendo expressas. Portanto, estes resultados também contribuem à verificação da expressão das proteínas recombinantes.

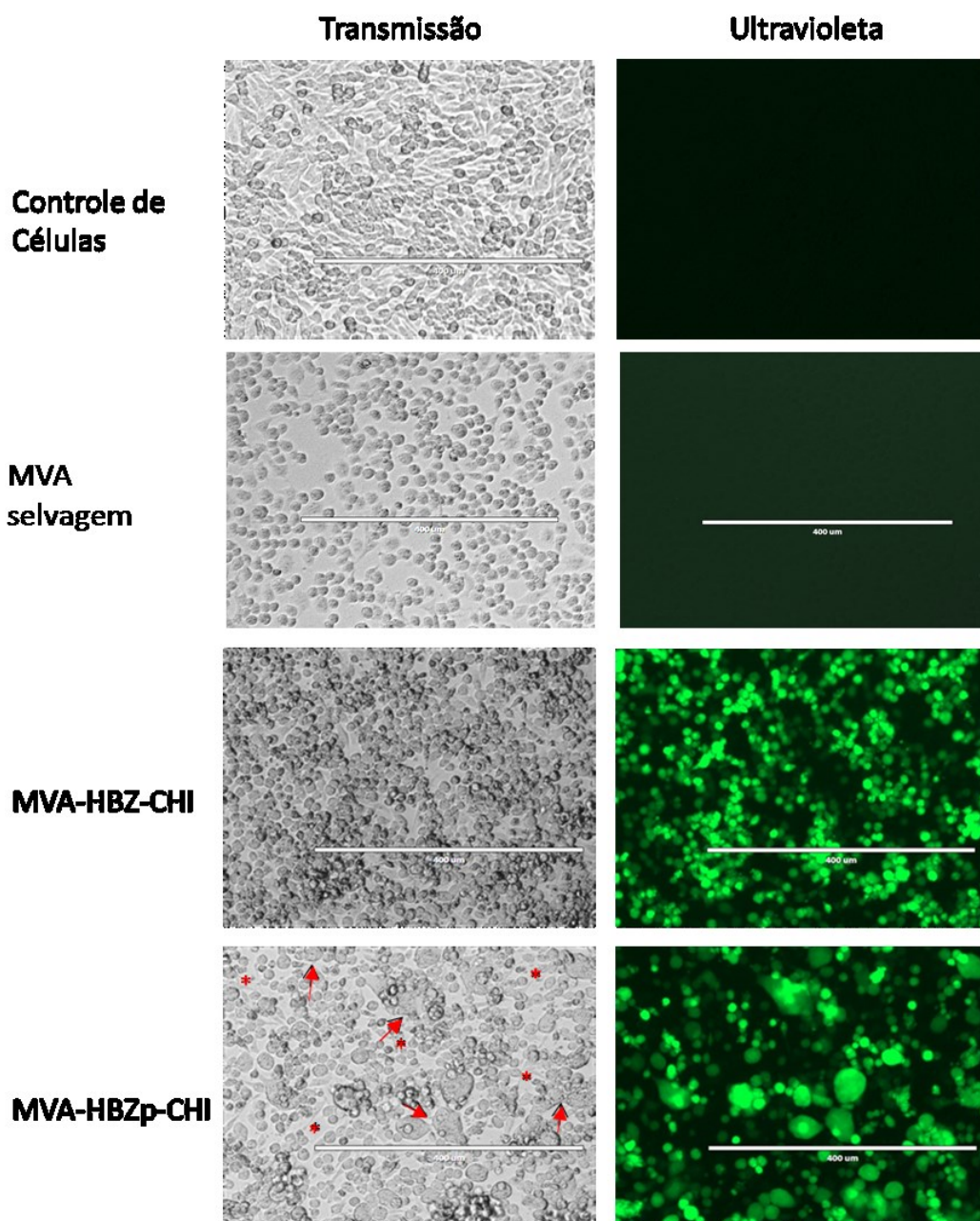


Figura 33 – Avaliação dos efeitos citopáticos nas células BHK-21 infectadas com os vírus recombinantes MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI. Fotografia retirada após 48 horas de infecção em microscopia de transmissão e ultravioleta. As colunas representam o tipo de luz emitida. As linhas representam o controle de células, controle de vírus e as células infectadas com os vírus recombinantes (MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI). O asterisco (*) indica o aumento do número de projeções citoplasmáticas, as setas vermelhas indicam a formação de sincício. A barra branca representa 400 μm. Foto obtida pelo microscópio de fluorescência EVOS® FL Cell Imaging System, Thermo Fisher no aumento de 400x.

6 DISCUSSÃO

O HTLV-1 é um vírus capaz de infectar seres humanos e causar uma infecção crônica e entidades mórbidas graves. Os indivíduos infectados podem desenvolver doenças leucêmicas, neurodegenerativas e inflamatórias. Estas doenças estão relacionadas com um alto índice de mortalidade ou morbidade, e gera um grande impacto na qualidade de vida de indivíduos infectados e no sistema único de saúde. Apesar da gravidade da infecção por HTLV-1, não existe nenhuma vacina ou terapia específica para o tratamento dessa enfermidade. Segundo Willems et al. (2017), para reduzir a carga global da infecção por HTLV-1 é necessário tomar as seguintes medidas: gerar estudos epidemiológicos de prevalência (estendê-los para além de doadores de bancos de sangue e de alguns pequenos grupos como mulheres grávidas), identificar biomarcadores de progressão de doenças, desenvolver vacinas profiláticas e terapêuticas, descobrir novas drogas e investir em pesquisa básica. Portanto, este trabalho foca no desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica a partir de pesquisa básica.

Vacinas terapêuticas combinam características tanto de vacinas profiláticas quanto de imunoterapias. O mecanismo de ação de vacinas terapêuticas se baseia no recrutamento do sistema imune do hospedeiro para combater uma doença já estabelecida. O princípio da vacina terapêutica é a indução de uma imunidade celular, uma vez que linfócitos T CD8⁺ são capazes de identificar células infectadas de forma específica e induzir a lise celular. As vacinas terapêuticas podem ser desenvolvidas em diferentes plataformas, como proteínas recombinantes, baseada em distintos vetores (DNA, vírus ou bactérias) ou células (BOUKHEBZA et al. 2012). A hipótese para o uso da vacina terapêutica em indivíduos infectados pelo HTLV-1 é a manutenção do quadro assintomático e o melhoramento de pacientes com ATL e HAM/TSP.

O vírus MVA é um vírus atenuado utilizado como vetor vacinal. No processo de atenuação, houve a perda da capacidade de multiplicar efetivamente em células de mamíferos e de evadir o sistema imunológico. O MVA é geneticamente estável e permite a inserção de DNA exógeno, permitindo uma controlada expressão. O MVA já foi utilizado em campanhas de vacinação e se mostrou um vetor seguro, apresentando a facilidade de uma eventual aprovação para novos produtos terapêuticos pelos órgãos competentes, dado o seu uso pregresso. Além disso, é capaz de induzir o sistema imune inato e adaptativo (COTTINGHAM; CARROLL, 2013). Devido a essas características o MVA foi escolhido como o vetor da vacina terapêutica contra o HTLV-1.

O presente trabalho teve como objetivo a construção de vírus MVA recombinantes com o intuito da geração de uma vacina terapêutica para o HTLV-1. O antígeno escolhido para ser expresso pelo vetor foi baseado na proteína viral HBZ. A proteína HBZ vem sendo apontada como alvo para o desenvolvimento de terapias por diferentes grupos de pesquisa, devido à importância desta proteína na indução da proliferação celular e evasão do sistema imunológico, induzindo a persistência viral e patogênese (MAHIEUX, 2015). Além disso, a proteína HBZ é constantemente expressa em todas as células infectadas em pacientes apresentando todos os quadros clínicos, e possui sequência de aminoácidos bastante conservada. Hilburn et al. (2011) detectaram células T CD4 e CD8 específicas para HBZ em metade de pacientes assintomáticos e com HAM/TSP estudados, e verificou que a presença de CTLs específicos para HBZ em pacientes está relacionada com baixa carga proviral e ao estado assintomático. Assim como MacNamara et al. (2010) verificaram que portadores assintomáticos possuem HLA de classe I que se ligam mais fortemente a peptídeos derivados de HBZ quando comparados com portadores de HAM/TSP.

A proteína Tax é a proteína acessória imunodominante. Estudos baseados na proteína Tax como vacina, como descrito por Sundaram et al (2003) e Ohashi et al (2000), apresentaram resultados promissores em modelo animal. Como a imunogenicidade de Tax é alta, a expressão desta é frequentemente silenciada em pacientes com ATL, como forma do vírus evadir ao sistema imunológico. Desta forma, peptídeos de Tax não seriam eficientes como vacina terapêutica em pacientes com ATL. Porém poderia ser também uma alternativa de vacina terapêutica para pacientes assintomáticos. Diferentemente, a proteína HBZ, como é expressada em células de todos os pacientes, esta pode ser utilizada como alvo terapêutico em pacientes dos diferentes quadros clínicos.

A proteína HBZ é menos imunogênica quando comparada com Tax. Uma razão para essa baixa imunogenicidade, pode estar relacionado a baixa produção da proteína HBZ pelas células infectadas, que tem como resultado uma fraca resposta celular. Porém, Sugata e colaboradores (2015) verificaram que a imunização repetida com peptídeos de HBZ é capaz de induzir uma produção alta de CTL efetiva.

Designou-se neste trabalho a construção de proteínas multiepitopo contendo peptídeos da proteína HBZ. Apesar da proteína HBZ ser indicada como um alvo terapêutico, esta é pouco imunogênica, quando comparada com outras proteínas virais (MA; YASUNAGA; MATSUOKA, 2016). Uma forma de contrapor esta desvantagem é a construção de proteínas multiepitopos, contendo as regiões imunodominantes da proteína. A estratégia de se utilizar proteínas multiepitopos é promissora, pois estas possuem várias vantagens como: consistem

em diferentes epitopos que permitem a expansão do espectro de alvos na infecção viral; apresentam epitopos de CTL que induzem uma robusta resposta celular; são capazes de gerar respostas imunológicas duradouras, e a ausência de regiões não desejadas, como no uso de proteínas inteiras, posto que possuem regiões que induzem patogênese e efeitos adversos (ZHANG, 2017).

Para a construção da proteína multiepitopo foram utilizados dados da literatura e análises *in silico*. Foram escolhidos os seguintes epitopos da literatura, $_{42}$ AVLDGLLSL $_{50}$ (MACNAMARA et al. 2010) e $_{157}$ QELGIDGYTRQLEGEVESLE $_{176}$ (SUGATA et al. 2015). Segundo Sugata et al (2015), este epitopo foi capaz de induzir forte resposta celular em camundongos e macacos, e que células efectoras estimuladas com esse peptídeo foram capazes de matar células alvo em co-cultura. MacNamara et al. (2010) identificaram esse peptídeo através de análise *in silico* e mostraram que células naturalmente infectadas por HTLV-1 são lisadas por clones T CD8⁺ específico para HBZ. Estes autores sugerem que células T CD8⁺ específicas para HBZ sejam cruciais na prevenção da proliferação de células infectadas, bloqueando a estratégia de persistência viral. Diante desses dados promissores, esses peptídeos foram escolhidos para compor a proteína multiepitopo. Além disso, o epitopo HBZ $_{42-50}$ e regiões do epitopo HBZ $_{157-176}$ foram identificados nas três ferramentas de predição de epitopos testadas durante este trabalho. A predição de epitopos também identificou outros três potenciais epitopos de célula T CD8⁺. Os cinco peptídeos foram desenhados em uma sequência multiepitopo, contendo sequências que garantiram a clonagem, transcrição, tradução do gene e detecção da proteína.

Os epitopos HBZ $_{18-27}$, HBZ $_{22-30}$, HBZ $_{26-34}$ e HBZ $_{42-50}$ estão localizados no domínio ativador da proteína HBZ. O domínio ativador da proteína HBZ está relacionada com interações com CBP/p300, c-jun, GADD34. Enquanto o epitopo HBZ $_{157-176}$ está inserido na região bZIP. Esta região está relacionada com CREB, ATF3, proteínas da família Jun. As duas regiões também estão relacionadas com a ligação com a proteína p65 e com o promotor de hTERT (MATSUOKA; GRENN, 2009; MA; YASUNAGA; MATSUOKA, 2016).

Foram construídos dois vírus recombinantes, MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI, sendo a presença de um peptídeo sinal na sequência multiepitopo do MVA-HBZp-CHI a diferença entre eles. O peptídeo sinal (tPA) foi inserido com a intenção de direcionar a proteína recombinante às vias de secreção. Kou et al. (2017) compararam a eficiência do peptídeo sinal tPA em MVA recombinante, sendo demonstrado que a adição do tPA aumentou a expressão e promoveu a secreção da proteína recombinante, além de ter aumentado o nível das respostas humoral e celular. Dessa forma, espera-se que os dois vírus

induzam respostas diferentes, e que uma das construções possa se mostrar um melhor candidato vacinal, devido à presença ou ausência do peptídeo sinal. Conforme discutido anteriormente, a construção contendo o peptídeo sinal mostrou produção viral assemelhada à construção sem o mesmo (títulos 10^9). Porém, na quimera contendo o peptídeo sinal, o efeito citopático mostrou eventos distintos, incluindo a formação importante de sincícios. Estes eventos seguramente podem indicar o processamento e apresentação distintos da molécula multiepitopo contendo o peptídeo sinal, embora não haja dados reportados na literatura que discutam a relação deste fenômeno biológico com o melhor ou pior desempenho de quimeras, o que deverá ser objeto de estudos futuros de nosso grupo. Sugere-se que esse efeito citopático seja resultado da indução do estresse do retículo endoplasmático celular, uma vez que pode haver o acúmulo de proteínas desenoveladas no lúmen do retículo endoplasmático, devido ao direcionamento das proteínas recombinantes à esta organela pelo peptídeo sinal (LEÃO, 2017).

Os vírus MVA recombinantes foram gerados através da recombinação homóloga entre o DNA viral e o plasmídeo de transferência pLW44. O plasmídeo contém regiões flangeadoras homólogas ao DNA do MVA, a homologia permite a recombinação entre as duas regiões, dando origem ao MVA recombinante. A partir da troca de genes, o MVA passa a expressar a proteína GFP, que permitiu a detecção de clones recombinantes, e a expressão da proteína recombinante, que está sob a indução de um promotor forte, mH5, um promotor modificado do vírus *Vaccinia*, do tipo tardio/precoce, que garante a expressão da proteína recombinante durante todo o ciclo de multiplicação (QUINAN, 2014). A proteína GFP foi utilizado como repórter molecular, pois é facilmente expressa em cultura celular e requer apenas irradiação próximo de UV para a sua detecção. Desta forma, os vírus MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI foram facilmente gerados e devido a detecção de GFP, estes foram selecionados e amplificados. A amplificação viral foi feita em células BHK-21 devido à fácil obtenção, manipulação e manutenção quando comparado às células primárias CEF, apesar de se obter títulos virais um pouco mais baixos na primeira. A constante presença de monocamadas de células totalmente infectadas expressando GFP no processo de expansão confirmou a eliminação de clones selvagens contaminantes. Uma vez que estes apresentam vantagens metabólicas em relação às amostras recombinantes, seria observada a presença de células infectadas sem expressão de GFP, caso houvesse contaminação.

A confirmação da inserção das sequências multiepitopo nos vírus recombinantes se deu a partir da PCR e sequenciamento. Através da PCR, verificou-se que os iniciadores desenhados e as condições das reações foram muito específicas para amplificar os insertos,

pois não se observou a presença de bandas inespecíficas. Pela PCR foi possível então confirmar a presença dos insertos nos vírus recombinantes, apresentando a quantidade de pares de bases esperada. Como os vírus foram submetidos à diversas passagens celulares, mutações ou deleções poderiam ocorrer. Para garantir a integridade das sequências nucleotídicas, foi feito o sequenciamento genético. No sequenciamento foi verificado que as sequências multiepitopo apresentaram 100% de identidade com a sequência desenhada, garantindo a adequada expressão do gene, apresentando-se em janela de leitura e com os códons de iniciação e terminação. Da mesma forma, o resultado da RT-PCR confirmou a transcrição dos genes HBZ-CHI e HBZp-CHI. A amplificação do cDNA gerado pela transcrição reversa do mRNA viral possibilitou a confirmação de transcritos referentes aos genes de interesse. Como foi realizado o tratamento da amostra com DNase, garantiu-se que a amplificação não é de DNA contaminante da amostra.

Para confirmar a tradução do mRNA detectado, foi realizado ensaios de *Western blot* com o intuito de avaliar a produção das proteínas recombinantes em células infectadas. O *Western blot* foi realizado utilizando diferentes anticorpos, o anti-FLAG que reconhece a etiqueta FLAG e soros de indivíduos positivos e negativos para HTLV-1. No entanto, não foi possível detectar as proteínas recombinantes por nenhuma das alternativas disponíveis. Quando se utilizou o anti-FLAG, acredita-se que a metodologia adotada não foi específica para a detecção das proteínas ou houve falha na padronização. Houve a marcação de bandas inespecíficas e o mesmo perfil de marcação entre as amostras e os controles. Diante dessa dificuldade, foi utilizado extrato de células infectadas com diferentes m.o.i e diferentes metodologias de revelação, porém não houve sucesso em detectar a expressão das proteínas por esse ensaio. A dificuldade da detecção também pode estar relacionada ao baixo peso molecular da proteína (~9kDa). Na corrida eletroforética não houve uma separação eficiente das proteínas de baixo peso molecular, havendo o acúmulo dessas proteínas. Como houve a detecção de proteínas inespecíficas do mesmo tamanho das proteínas recombinantes, essas podem ter sido mascaradas pelas marcações inespecíficas.

Não houve sucesso também no *Western blot* em que foi utilizado soro de pacientes para avaliar a expressão das proteínas multiepitopos de HBZ. Não houve marcação específica do tamanho esperado nas amostras, tampouco foi observada diferenças no perfil de bandas inespecíficas marcadas entre as amostras e os controles e entre os grupos de soros positivos e negativos, embora o perfil de bandas apresentado para cada um dos "pool" de soros tenha sido distinto. O insucesso em detectar a proteína usando soro pode estar relacionado ao fato já descrito na literatura, de que a minoria dos indivíduos infectados com HTLV-1 apresenta

anticorpos anti-HBZ detectáveis, variando entre 10 a 16% (ENOSE-AKAHATA, et al., 2013; SHIOHAMA et al., 2016). Devido à não produção ou baixa produção de anticorpos anti-HBZ pela maioria dos pacientes, essa abordagem talvez não seja a mais adequada para a detecção da proteína multiepitopo HBZ. No entanto, não foi possível a utilização de outros métodos para analisar a expressão das proteínas e a produção de um anticorpo policlonal em coelhos, utilizando a proteína total HBZ produzida em vetor procarioto está em curso no LVBA buscando atingir este fim.

Apesar da técnica de *Western blot* não ter sido capaz de detectar as proteínas recombinantes. Há diversos indicativos de que as proteínas multiepitopos estão sendo expressadas, como a detecção do RNA, somente durante a infecção celular com os vírus recombinantes e não quando da infecção celular pelo vírus selvagem, juntamente ao sequenciamento genético dos vírus recombinantes gerados.

Contudo, foi realizado com sucesso a produção de dois vírus recombinantes, MVA-HBZ-CHI e MVA-HBZp-CHI. Há indicativos que estes vírus são capazes de expressar proteínas recombinantes multiepitopo baseadas na proteína HBZ do HTLV-1. Baseado nas análises *in silico* e na revisão da bibliografia, os vírus recombinantes construídos neste projeto apresentam um potencial para o desenvolvimento de uma vacina terapêutica para o HTLV-1. Acredita-se que as proteínas recombinantes são capazes de induzir células T citotóxicas específicas para HBZ e que estas sejam capazes de lisar células infectadas, desta forma, havendo o controle da infecção e impedindo ou retardando a evolução das doenças causadas por HTLV-1.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para este trabalho, deseja-se detectar diretamente a expressão da proteína através de ensaios mais específicos, como por citometria de fluxo, que possibilita a marcação da proteína com anticorpos marcados com fluorescência, assim como a verificação da secreção da proteína com peptídeo sinal. Pretende-se também produzir soro policlonal anti-HBZ, utilizando a inoculação da proteína HBZ produzida em procarioto em modelo cunicular, para comprovar a expressão das proteínas em ensaios de Western blot e citometria de fluxo.

Uma vez comprovada a expressão das proteínas, deseja-se avaliar o potencial imunogênico dos vírus recombinantes expressando as proteínas multiepitopo de HBZ. Pretende-se induzir a produção de CTLs anti-HBZ, através da infecção de linfócitos com os vírus recombinantes e realizar um ensaio de cocultura entre as CTLs e células infectadas com HTLV-1, tanto a linhagem MT-2 quanto células de pacientes. Desta forma, será possível quantificar a lise das células infectadas e demonstrar a potencial dos vírus recombinantes como candidatos à vacina terapêutica para o HTLV-1.

Com o avanço da pesquisa, pretende-se avaliar o potencial a vacina terapêutica em modelos *in-vivo*. Desta forma, será possível prosseguir para modelos mais avançados, validar as vacinas terapêuticas e seguir para testes pré-clínicos. Definir a via de inoculação, a dose da vacina, a estratégia de imunização prime-boost, sendo homóloga ou heteróloga.

Além disso, os vírus recombinantes serão fonte de estudos em virologia básica e biologia celular. Deseja-se compreender o efeito citopático causado pela proteína com o peptídeo sinal, estudar se está relacionado com o estresse do retículo endoplasmático.

8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que foi possível identificar cinco epitopos da proteína HBZ em análise *in silico* e em revisão bibliográfica, sendo possível a construção de duas proteínas quiméricas contendo os epitopos selecionados, com o potencial de induzir respostas citotóxicas.

A construção de dois vírus recombinantes baseados na plataforma MVA expressando as proteínas multiepitopos de HBZ foi executada com sucesso através da recombinação homóloga.

Apesar de não ter sido possível a detecção das proteínas por ensaio de *Western blot*, a amplificação de parte do cassete gênico a partir de RNA total de células infectadas, o efeito citopático distinto apresentado durante a infecção celular com os dois vírus recombinantes produzidos, juntamente ao sequenciamento genético dos vírus são fortes indicativos de que as proteínas recombinantes estão sendo expressadas pelos vetores virais.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIMOTO, M. et al. Anti-HTLV-1 tax antibody and tax-specific cytotoxic T lymphocyte are associated with a reduction in HTLV-1 proviral load in asymptomatic carriers. **Journal of medical virology**, v. 79, n. 7, p. 977-986, 2007

ALBERTI, C. et al. Molecular and clinical effects of betamethasone in human t-cell lymphotropic virus type-i-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. **Journal of medical virology**, v. 83, n. 9, p. 1641-1649, 2011.

ANDRADE, R. G. et al. Strong correlation between tax and HBZ mRNA expression in HAM/TSP patients: Distinct markers for the neurologic disease. **Journal of Clinical Virology**, v. 56, n. 2, p. 135-140, 2013.

ARAÚJO, A. Q. C.; SILVA, M. T. T. The HTLV-1 neurological complex. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 12, p. 1068-1076, 2006.

BALESTRIERI, E. et al. Effect of phosphonated carbocyclic 2'-oxa-3'-aza-nucleoside on human T-cell leukemia virus type 1 infection in vitro. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 54-64, 2008.

BANGHAM, C. R. M. The immune response to HTLV-I. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 4, p. 397-402, 2000.

BANGHAM, C. R. M.; OSAME, M. Cellular immune response to HTLV-1. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6035-6046, 2005.

BARBEAU, B.; MESNARD, J.-M. Does chronic infection in retroviruses have a sense? **Trends in microbiology**, v. 23, n. 6, p. 367-75, 2015.

BARBEAU, B.; PELOPONESE, J.-M.; MESNARD, J.-M. Functional comparison of antisense proteins of HTLV-1 and HTLV-2 in viral pathogenesis. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 226, 2013.

BAZARBACHI, A. et al. Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 27, p. 4177-4183, 2010.

BLUM, J. S., WEARSCH, P.A., CRESSWELL, P. Pathways of antigen processing. **Annual review of immunology**, v. 31, p.443-473, 2013.

BOBEK, V. et al. A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. **Anticancer Research**, v. 30, n. 12, p. 4799-4804, 2010.

BOUKHEBZA, H. et al. Therapeutic vaccination to treat chronic infectious diseases: current clinical developments using MVA-based vaccines. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 8, n. 12, p. 1746-1757, 2012.

BOXUS, M. et al. The HTLV-1 Tax interactome. **Retrovirology**, v. 5, p. 76, 2008.

BRITTO, V. L. S.; CORREA, R.; VINCENT, M., B. Proprioceptive neuromuscular facilitation in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2014.

CARPENTIER, A. et al. Modes of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Transmission, Replication and Persistence. **Viruses**, v. 7, n. 7, p. 3603–3624, 2015.

CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. DE F.; PROIETTI, F. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cadernos de saúde pública**, v. 21, n. 3, p. 926–31, 2005.

CAVANAGH, M. H. et al. HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3'LTR are alternatively spliced and polyadenylated. **Retrovirology**, v. 3, n. 1, 2006.

CAVROIS, M. et al. Common Human T Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Integration Sites in Cerebrospinal Fluid and Blood Lymphocytes of Patients with HTLV-1 – Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis Indicate that HTLV-1 Crosses the Blood-Brain Barrier via Clo. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 4, p. 1044–50, 2000.

CLERC, I. et al. An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 35, p. 23903–13, 2008.

COCHRANE, A. Retroviruses. In: ACHESON N. H., et al. **Fundamentals of Molecular Virology**. 2 ed. Wiley, 2011. Cap 28, p. 342-353.

CONDIT, R. C. Poxviruses. In: ACHESON N. H., et al. **Fundamentals of Molecular Virology**. 2 ed. Wiley, 2011. Cap 26, p. 312-323.

COLISSON, R. et al. Free HTLV-1 induces TLR7-dependent innate immune response and TRAIL relocalization in killer plasmacytoid dendritic cells. **Blood**, v. 115, n. 11, p. 2177–2185, 2010.

COOK, L. B. et al. HTLV-1: persistence and pathogenesis. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 131-140, 2013.

COTTINGHAM, M. G., CARROLL, M. W. Recombinant MVA vaccines: dispelling the myths. **Vaccine**, v. 31, n. 39, p. 4247-4251, 2013.

CRODA. M. G. et al., Corticosteroid therapy in TSP/HAM patients: the results from a 10 years open cohort. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 269, n. 1, p. 133-137, 2008.

DAKAPPAGARI, N. K. et al. Intracellular delivery of a novel multiepitope peptide vaccine by an amphipathic peptide carrier enhances cytotoxic T-cell responses in HLA-A* 201 mice. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 65, n. 2, p. 189-199, 2005.

- DELALOYE, J. et al. Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 6, 2009.
- DIPTI, C. A.; JAIN S. K.; NAVIN K. A novel recombinant multiepitope protein as a hepatitis C diagnostic intermediate of high sensitivity and specificity. **Protein expression and purification**, v. 47, n. 1, p. 319-328, 2006.
- DREXLER, I.; STAIB, C.; SUTTER, G. Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: How can we best use its potential? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 506–512, 2004.
- ENOSE-AKAHATA, Y. et al. Humoral immune response to HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) in HTLV-1-infected individuals. **Retrovirology**, v. 10, n. 1, p. 19, 2013.
- ENOSE-AKAHATA, Y.; VELLUCI, A.; JACOBSON, S. Role of HTLV-1 Tax and HBZ in the Pathogenesis of HAM/TSP. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.
- ESSER, A. K. et al. HTLV-1 viral oncogene HBZ induces osteolytic bone disease in transgenic mice. **Oncotarget**, v. 8, n. 41, 2017.
- FRANCHINI, G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. **Blood**, v. 86, n. 10, p. 3619-3639, 1995.
- FRANCHINI, G. et al. Highly attenuated HTLV type I env poxvirus vaccines induce protection against a cell-associated HTLV type I challenge in rabbits. **AIDS research and human retroviruses**, v. 11, n. 2, p. 307-313, 1995.
- FRANGIONE-BEEBE, M. et al. Enhanced immunogenicity of a conformational epitope of human T-lymphotropic virus type 1 using a novel chimeric peptide. **Vaccine**, v. 19, n. 9, p. 1068-1081, 2000.
- FUJII, H. et al. A potential of an anti-HTLV-I gp46 neutralizing monoclonal antibody (LAT-27) for passive immunization against both horizontal and Mother-to-Child vertical infection with human T cell leukemia virus Type-I. **Viruses**, v. 8, n. 2, 2016.
- FUJII, H. T. et al. Immunopathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Life Sciences**, v. 104, n. 1-2, p. 9–14, 2014.
- GAUDRAY, G. et al. The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. **Journal of virology**, v. 76, n. 24, p. 12813-12822, 2002.
- GESSAIN, A. et al. HTLV-3/4 and simian foamy retroviruses in humans: discovery, epidemiology, cross-species transmission and molecular virology. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 187–99, 2013.
- GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 388, 2012.

GESSAIN, A.; MAHIEUX, R. Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: Clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects. **Revue Neurologique**, v. 168, n. 3, p. 257–269, 2012.

GILBERT, R., MASSIE, B. Eukaryotic Viral Vectors. In: ACHESON N. H., et al. **Fundamentals of Molecular Virology**. 2 ed. Wiley, 2011. Cap 37, p. 456-469.

GOFF, S. P. Retroviridae. In: KNIPE, D. M., et al. **Fields Virology**. 6 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, v. 1, 2013. Cap. 47, p. 1424-1473.

GOON, P. K. C. 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**, v. 99, n. 9, p. 3335–3342, 2002.

GOON, P. K. C. et al. High circulating frequencies of tumor necrosis factor alpha-and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific CD4+ T cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease. **Journal of virology**, v. 77, n. 17, p. 9716-9722, 2003.

GRANT, Christian et al. Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. **Journal of cellular physiology**, v. 190, n. 2, p. 133-159, 2002.

GUERREIRO, J. B. et al. Spontaneous neutrophil activation in HTLV-1 infected patients. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 9, n. 6, p. 510–514, 2005.

HALIN, M. et al. Human T-cell leukemia virus type 2 produces a spliced antisense transcript encoding a protein that lacks a classic bZIP domain but still inhibits Tax2-mediated transcription. **Blood**, v. 114, n. 12, p. 2427–2438, 2009.

HIDAKA, M.; INOUE, J. Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. **The EMBO Journal**, v. 7, n. 2, p. 519–523, 1987.

HILBURN, S. et al. In vivo expression of human T-lymphotropic virus type 1 basic leucine-zipper protein generates specific CD8+ and CD4+ T-lymphocyte responses that correlate with clinical outcome. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 4, p. 529-536, 2011.

JACOBS, B. L. et al. Vaccinia virus vaccines: past, present and future. **Antiviral research**, v. 84, n. 1, p. 1-13, 2009.

JONES, K. S. et al. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. **Nature medicine**, v. 14, n. 4, p. 429–436, 2008.

JOURNO, C.; MAHIEUX, R. HTLV-1 and innate immunity. **Viruses**, v. 3, n. 8, p. 1374–1394, 2011.

KASTNMULLER, W. et al. Cross-competition of CD8⁺ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 9, p. 2187-2198, 2007.

KATAMINE, S. et al. HTLV-I proviral DNA in umbilical cord blood of babies born to carrier mothers. **The Lancet**, v. 343, n. 8909, p. 1326-1327, 1994.

KATO, K.; AKASHI, K. Recent advances in therapeutic approaches for adult T-cell leukemia/lymphoma. **Viruses**, v. 7, n. 12, p. 6604–6612, 2015.

KAZANJI, M. et al. Chimeric peptide vaccine composed of B-and T-cell epitopes of human T-cell leukemia virus type 1 induces humoral and cellular immune responses and reduces the proviral load in immunized squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **Journal of general virology**, v. 87, n. 5, p. 1331-1337, 2006.

KAZANJI, M. et al. Expression and immunogenicity in rats of recombinant adenovirus 5 DNA plasmids and vaccinia virus containing the HTLV-I-env gene. **International journal of cancer**, v. 71, n. 2, p. 300-307, 1997.

KHABBAZ, R. F. et al. Seroprevalence of HTLV-I and HTLV-II among intravenous drug users and persons in clinics for sexually transmitted diseases. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 6, p. 375-380, 1992.

KOU, Y. et al. Tissue plasminogen activator (tPA) signal sequence enhances immunogenicity of MVA-based vaccine against tuberculosis. **Immunology letters**, v. 190, p. 51-57, 2017.

KOVJAZIN, R., CARMON, L. The use of signal peptide domains as vaccine candidates. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 10, n. 9, p. 2733-2740, 2014.

KUSUHARA, K. et al. Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1): A fifteen-year follow-up study in Okinawa, Japan. **International journal of cancer**, v. 40, n. 6, p. 755-757, 1987.

LEÃO, T. L. **Indução do estresse do retículo endoplasmático celular pelo Vaccinia virus: modulação da via UPR durante a infecção viral**. Belo Horizonte: UFMG, 2017.

LEMASSON, I. et al. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP protein interacts with the cellular transcription factor CREB to inhibit HTLV-1 transcription. **Journal of virology**, v. 81, n. 4, p. 1543–1553, 2007.

LEVIN, M. C. et al. Cross-reactivity between immunodominant human T lymphotropic virus type I tax and neurons: implications for molecular mimicry. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 10, p. 1514–1517, 2002.

LOUREIRO, P., LOPES, M. S. S. N. Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATL). In: PROIETTI, A. B. F. C. **Cadernos Hemominas - HTLV**. 6 ed. v. XVI. Belo Horizonte: Fundação Hemominas, 2015. Cap. 9, p. 149-187.

MA, G.; YASUNAGA, J.-I.; MATSUOKA, M. Multifaceted functions and roles of HBZ in HTLV-1 pathogenesis. **Retrovirology**, v. 13, n. 1, p. 16, 2016.

MA Y., et al. The HTLV-1 HBZ protein inhibits cyclin D1 expression through interacting with the cellular transcription factor CREB. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 10, p. 5967-5975, 2013.

MA, Y. et al. HTLV-1 basic leucine zipper factor downregulates cyclin D1 expression via interactions with NF- κ B. **International journal of molecular medicine**, v. 39, n. 3, p. 764-770, 2017.

MACNAMARA, A. et al. HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 9, 2010.

MAHIEUX, R. A vaccine against HTLV-1 HBZ makes sense. **Blood**, v. 126, n. 9, p. 1052-1053, 2015.

MARRIOTT, S. J.; SEMMES, O. J. Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response. **Oncogene**, v. 24, n. 2005, p. 5986–5995, 2005.

MARTIN, J. L. et al. Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. **Viruses**, v. 8, n. 2, p. 1–22, 2016.

MATSUOKA, M.; FUJII, M. Human T-Cell Leukemia Virus Types 1 and 2. In: KNIPE, D. M., et al. **Fields Virology**. 6 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, v.1, 2013 Cap. 48, p 1474-1501.

MATSUOKA, M.; GREEN, P. L. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. **Retrovirology**, v. 6, p. 71, 2009.

MATSUOKA, M.; JEANG, K.-T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 4, p. 270–80, 2007.

MATUTES, E. Adult T-cell leukaemia/lymphoma. **Journal of clinical pathology**, v. 60, n. 12, p. 1373–1377, 2007.

MESNARD, JM. et al. Roles of HTLV-1 basic zip factor (HBZ) in viral chronicity and leukemic transformation. Potential new therapeutic approaches to prevent and treat HTLV-1-related diseases. **Viruses**, v. 7, n. 12, p. 6490-6505, 2015

MICHAEL, B.; NAIR, A.; LAIRMORE, M. D. Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T cell activation, and cellular gene expression. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 9, p. 2556-2576, 2004.

MOENS, B. et al. Ascorbic acid has superior ex vivo antiproliferative, cell death-inducing and immunomodulatory effects over IFN- α in HTLV-1-associated myelopathy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 7, p. e1729, 2012.

MOSS, B. Poxviridae. In: KNIPE, D. M., et al. **Fields Virology**. 6 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, v. 1, 2013. Cap. 66, p. 2129-2159.

MUKAI, R.; OHSHIMA, T. HTLV-1 HBZ positively regulates the mTOR signaling pathway

via inhibition of GADD34 activity in the cytoplasm. **Oncogene**, v. 33, n. 18, p. 2317–28, 2014.

MURATA, K. et al. A novel alternative splicing isoform of human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ-SI) targets distinct subnuclear localization. **Journal of virology**, v. 80, n. 5, p. 2495-2505, 2006.

MURPHY, E. L. Infection with human T-lymphotropic virus types-1 and -2 (HTLV-1 and -2): Implications for blood transfusion safety. **Transfusion clinique et biologique : journal de la Société française de transfusion sanguine**, v. 23, n. 1, p. 13–19, 2016.

MURPHY, E. L. et al. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Annals of internal medicine**, v. 111, n. 7, p. 555-560, 1989.

NAKAMURA, T. HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): The role of HTLV-I-infected Th1 cells in the pathogenesis, and therapeutic strategy. **Folia Neuropathologica**, v. 47, n. 2, p. 182–194, 2009.

NAKAMURA, H. et al. Protection of cynomolgus monkeys against infection by human T-cell leukemia virus type-I by immunization with viral env gene products produced in Escherichia coli. **International journal of cancer**, v. 40, n. 3, p. 403-407, 1987.

NEJMEDDINE, M.; BANGHAM, C. R. M. The HTLV-1 virological synapse. **Viruses**, v. 2, n. 7, p. 1427–1447, 2010.

OHASHI, T. et al. Prevention of adult T-cell leukemia-like lymphoproliferative disease in rats by adoptively transferred T cells from a donor immunized with human T-cell leukemia virus type 1 Tax-coding DNA vaccine. **Journal of virology**, v. 74, n. 20, p. 9610-9616, 2000.

OHSIMA, K. Molecular Pathology of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. **Oncology**, v. 89, p. 7–15, 2015.

OLIÈRE, S. et al. Modulation of innate immune responses during human T-cell leukemia virus (HTLV-1) pathogenesis. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 22, n. 4, p. 197–210, 2011.

OOSTENDORP, R. A. J. Secretion of Wnts is dispensable for hematopoiesis. **Blood**, v. 126, n. 9, p. 1051–1052, 2015.

OSAME, M. Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I – associated myelopathy (HAM / TSP). **Journal of neuroimmunology**, v. 8, p. 359–364, 2002.

PAIS-CORREIA, A.-M. et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. **Nature medicine**, v. 16, n. 1, p. 83–89, 2010.

PIQUE, C.; JONES, K. S. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–14, 2012.

POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 77, n. 12, p. 7415-7419, 1980.

POXVIRIDAE. **Viral Zone**. 2014. Disponível em: <https://viralzone.expasy.org/174?outline=all_by_species>. Acesso em: 14 janeiro 2018.

PRICE, P. J.R. et al. Modified Vaccinia virus Ankara: innate immune activation and induction of cellular signalling. **Vaccine**. v. 31, n. 39, p. 4231-4234, 2013.

PROIETTI, A. B. F. C. Cadernos Hemominas - HTLV. 6 ed. v. XVI, Belo Horizonte: Fundação Hemominas, 2015.

QUINAN, B. R. **Construção, Avaliação da Imunogenicidade e Potencial Protetor, em Modelo Murino, de Diferentes Construções do *Vaccinia virus* Ankara Modificado (MVA) Expressando a Proteína E de *Dengue virus* Sorotipo 3**. Belo Horizonte: UFMG, 2014.

PROOYEN, N. V. et al. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 48, p. 20738-20743, 2010.

RAMÍREZ, J. C. et al. Attenuated modified vaccinia virus Ankara can be used as an immunizing agent under conditions of preexisting immunity to the vector. **Journal of virology**, v. 74, n. 16, p. 7651–7655, 2000.

ROCHA, C. D. et al. Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. **International Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 83–94, 2004.

ROMANELLI, L. C. F., TAKAYANAGUI, O. M., COSTA, C. M. C. Manifestações Neurológicas Associadas ao Vírus HTLV-1. In: PROIETTI, A. B. F. C. **Cadernos Hemominas - HTLV**. 6 ed. v. XVI. Belo Horizonte: Fundação Hemominas, 2015. Cap. 10, p. 189-218.

SAITO, M. et al. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Retrovirology**, v. 6, n. 1, p. 1, 2009.

SAITO, M. Immunogenetics and the pathological mechanisms of human T-Cell leukemia virus type 1- (HTLV-1-)associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 2010.

SÁNCHEZ-SAMPEDRO, L. et al. The evolution of poxvirus vaccines. **Viruses**, v. 7, n. 4, p. 1726-1803, 2015.

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

SATOU, Y. et al. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 2, 2011.

SEIKI, M. et al. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 80, n. 12, p. 3618-3622, 1983.

SHIOHAMA, Y., et al. Absolute quantification of HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) protein and its plasma antibody in HTLV-1 infected individuals with different clinical status. **Retrovirology**, 2016.

SUGATA, K. et al. Protective effect of cytotoxic T lymphocytes targeting HTLV-1 bZIP factor. **Blood**, v. 126, n. 9, p. 1095-1105, 2015.

SUHRBIER, A. Multi-epitope DNA vaccines. **Immunology and cell biology**, v. 75, n. 4, p. 402–408, 1997.

SUNDARAM, R. et al. A novel multivalent human CTL peptide construct elicits robust cellular immune responses in HLA-A* 0201 transgenic mice: implications for HTLV-1 vaccine design. **Vaccine**, v. 21, n. 21-22, p. 2767-2781, 2003.

SUN, S.C.; YAMAOKA, S. Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 5952–64, 2005.

SZYMOCHA, R. et al. Long-term effects of HTLV-1 on brain astrocytes: sustained expression of Tax-1 associated with synthesis of inflammatory mediators. **Journal of neurovirology**, v. 6, n. 4, p. 350-357, 2000.

TANAKA-NAKANISHI, A. et al. HTLV-1 bZIP factor suppresses apoptosis by attenuating the function of FoxO3a and altering its localization. **Cancer Research**, v. 74, n. 1, p. 188–200, 2014.

TAKEDA, S. et al. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. **International journal of cancer**, v. 109, n. 4, p. 559-567, 2004.

TAUTZ, D.; RENZ M. An optimized freeze-squeeze method for the recovery of DNA fragments from agarose gels. **Analytical biochemistry**, v. 132, n. 1, p. 14-19, 1983.

TAYLOR, G. P. et al., Zidovudine plus lamivudine in Human T-Lymphotropic Virus type-1-associated myelopathy: a randomised trial. **Retrovirology**, v. 3, p. 63, 2006.

TSUKASAKI, K.; TOBINAI, K. Biology and treatment of HTLV-1 associated T-cell lymphomas. **Best practice & research. Clinical haematology**, v. 26, n. 1, p. 3–14, 2013.

UCHIYAMA, T. et al. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. **Blood**, v. 50, n. 3, p. 481-492, 1977.

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

VERNIN, C. et al. HTLV-1 bZIP factor HBZ promotes cell proliferation and genetic instability by activating oncomiRs. **Cancer Research**, v. 74, n. 21, p. 6082–6093, 2014.

VITIELLO, A. et al. Development of a lipopeptide-based therapeutic vaccine to treat chronic HBV infection. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 95, p. 341–349, 1995.

WEN, B. et al. Signal peptide replacements enhance expression and secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins. **Acta Biochimica Biophysica Sinica**, p. 96–102, 2011.

WEN, Y.-M.; WANG, Y.-X. Biological features of hepatitis B virus isolates from patients based on full-length genomic analysis. **Reviews in medical virology**, v. 19, n. 1, p. 57–64, 2009.

WILLEMS, L. et al. Reducing the global burden of HTLV-1 infection: An agenda for research and action. **Antiviral research**, v. 137, p. 41-48, 2017.

YAMAMOTO-TAGUCHI, N. et al. HTLV-1 bZIP factor induces inflammation through labile Foxp3 expression. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 9, 2013.

YAMANO, Y. How does human T-lymphotropic virus type 1 cause central nervous system disease? The importance of cross-talk between infected T cells and astrocytes. **Clinical and Experimental Neuroimmunology**, v. 6, n. 4, p. 395-401, 2015.

YAMASAKI, K. et al. Long-term, high dose interferon-alpha treatment in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: a combined clinical, virological and immunological study. **Journal of Neurological Sciences**, v. 147, n. 2, p. 135-144, 1997.

YOSHIDA, M. et al., Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene. **Journal of virology**, v. 82, n. 19, p. 9359-9368, 2008.

ZAJAC M. P. et al. Induction of Both Local Immune Response in Mice and Protection in a Rabbit Model by Intranasal Immunization with Modified Vaccinia Ankara Virus Expressing a Secreted Form of Bovine Herpesvirus 1 Glycoprotein D. **Viral Immunology**, 2016.

ZHANG, L. Multi-epitope vaccines: a promising strategy against tumors and viral infections. **Cellular & molecular immunology**, 2017.

ZHAO, T. et al. The classical pathway of NF- κ B Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF- κ B. **Methods**, v. 113, n. 12, p. 2755–2764, 2012.

ZHI, H. et al. NF- κ B hyper-activation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 4, p. 1–12, 2011.

APÊNDICE A – Alinhamento das sequências sHBZ depositadas no *GenBank*, os epitopos selecionados estão destacados.

BAX35088.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX35079.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX35070.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX35061.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX35052.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX35043.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX35034.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX35025.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX35016.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX35007.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34998.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34980.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34971.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34944.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34935.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34926.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34917.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34899.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34890.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34881.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34872.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34863.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34854.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34845.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34836.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34827.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34818.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34809.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34800.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34791.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34782.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34773.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34764.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
ABB89742.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAE06226.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
BAX34962.1	MAASGLFRCLFVPCPEDELLV	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130

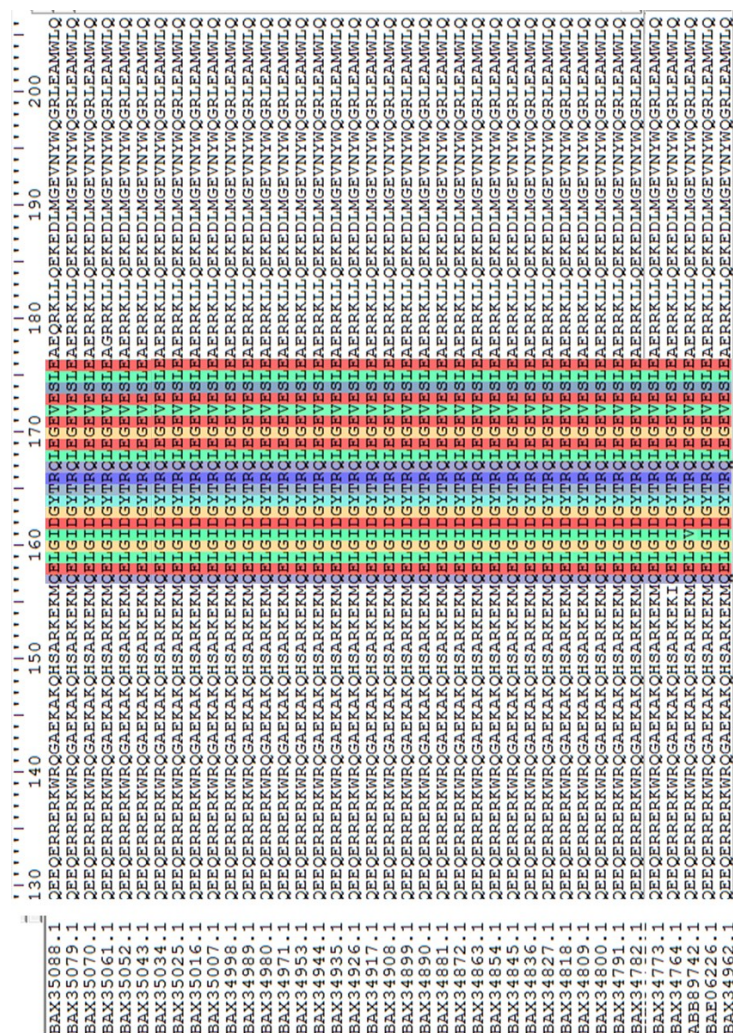


Figura 34 - Alinhamento das sequências da proteína sHBZ depositadas no GenBank. O número de identificação de cada sequência está indicado à esquerda da mesma. As sequências selecionadas para compor os cassetes gênicos estão destacas em cor.