

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Departamento de Cirurgia e Oftalmologia

Stephanie Santos de Almeida

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO A
DIFERENTES ESPECIFICIDADES HLA DE CLASSE I: uma abordagem *in silico***

Belo Horizonte
2018

Stephanie Santos de Almeida

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DE PEPTÍDEOS DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO A
DIFERENTES ESPECIFICIDADES HLA DE CLASSE I: uma abordagem *in silico***

Versão Final

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Cirurgia e
Oftalmologia da Faculdade de Medicina,
Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Cirurgia e
Oftalmologia.**

Orientador: Dr. Cristiano Xavier Lima

Belo Horizonte
2018

Almeida, Stephanie Santos de.

AL447 Estudo da interação de peptídeos do citomegalovírus humano a diferentes especificidades HLA de classe I [manuscrito]: uma abordagem in silico. / Stephanie Santos de Almeida. - - Belo Horizonte: 2022.
50f.: il.

Orientador (a): Cristiano Xavier Lima.

Área de concentração: Cirurgia e Oftalmologia.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Citomegalovirus. 2. Proteínas Virais. 3. Antígenos HLA. 4. Dissertação Acadêmica. I. Lima, Cristiano Xavier. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: QW 165.5.H3

Ficha Catalográfica: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697

Biblioteca J. Baeta Vianna - Campus Saúde da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À
OFTALMOLOGIA

UFMG

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA STEPHANIE SANTOS DE ALMEIDA

Realizou-se, no dia 13 de novembro de 2018, às 09:00 horas, Sala 526, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *Estudo da interação de peptídeos do citomegalovírus humano a diferentes especificidades HLA de classe I: Uma abordagem in silico*, apresentada por STEPHANIE SANTOS DE ALMEIDA, número de registro 2017660064, graduada no curso de BIOMEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Cristiano Xavier Lima - Orientador (UFMG), Prof(a). Vivian Resende (UFMG), Prof(a). Helton da Costa Santiago (ICB/UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

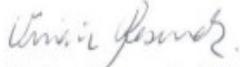
Aprovada

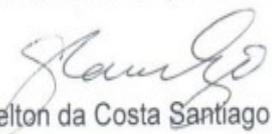
Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 13 de novembro de 2018.


Prof(a). Cristiano Xavier Lima (Doutor)


Prof(a). Vivian Resende (Doutora)


Prof(a). Helton da Costa Santiago (Doutor)

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão maior é pela presença de Deus na minha vida. Em todos os desafios e conquistas acadêmicas e pessoais durante este período, ele se manteve aqui, sempre me possibilitando correr atrás daquilo que acredito. Agradeço ao meu orientador, Dr. Cristiano Xavier Lima pela confiança e por todas as oportunidades de crescimento que ele me proporciona, assim como o departamento de cirurgia e oftalmologia, que me possibilitou acesso à conhecimentos extremamente necessários para a construção desse mestrado. A CAPES agradeço pela concessão da bolsa que permitiu minha dedicação integral aos estudos e à pesquisa. Agradeço ao Dr. Helton da Costa Santiago por ter aberto as portas do laboratório IMPAR para que eu pudesse conhecer mais sobre a imunologia, me encantar ainda mais por ela e por ter doado parte de seus conhecimentos em muitas das nossas conversas. Agradeço as pessoas que encontrei durante esse período, minhas amigas de departamento Ângela, Helena e Marília. Agradeço a família IMPAR que me recebeu com tanto carinho, sou muito grata por todos os momentos que tivemos juntos nesse período e pelo vínculo que criamos. Agradeço de modo muito especial a Camila e a Marcela por não medirem esforços em contribuir para que este trabalho fosse desenvolvido, assim como por proporcionarem momentos de descontração e tranquilidade em meio ao caos. Agradeço, do mesmo modo a Brenda e Vahély por acompanharem meus passos, acreditarem na minha capacidade de progredir e se manterem sempre por perto. Agradeço por último a minha base, pelo apoio nesses 23 anos de vida, minha mãe Ana Paula e meu pai José Aparício por todos os conselhos, pela preocupação e pelo conforto que me proporcionam. Minha avó Terezinha e minha irmã Larissa pela companhia, pelos programas de descontração e por acreditarem que tudo sempre dá certo no final, agradeço principalmente a vovó pelas ajudas no almoço e Lá por sempre querer um sorvete ou um hambúrguer para tirar qualquer problema da cabeça. Meus padrinhos Maria Aparecida e Paulo e meu primo-irmão Paulo Henrique pelos carinhos em momentos inesperados, pelo suporte, por acreditarem na minha dedicação e se manterem presentes. Agradeço ao Bobby, por não sair do meu lado em momentos de intensa dedicação. De modo geral, agradeço o dom da vida, da empatia e agradeço por ter a insistência de raros, em fazer ciência.

“Sabe desde o início: alma, espírito, corpo, mente
Sua jornada diligente faz valer o sacrifício. É isso”.
- Cosmic Jesus, Forfun.

RESUMO

O Citomegalovírus (HCMV) é o maior vírus pertencente à classe dos herpesvírus humanos, da família *Herpesviridae*. Em pacientes imunocompetentes, a infecção primária por HCMV é geralmente oligoassintomática e sua reativação muito infrequente. Entretanto, em pacientes imunossuprimidos, a doença primária é acompanhada de alta morbimortalidade e os episódios de reativação muito recorrentes e sintomáticos. Em pacientes transplantados de órgãos ou tecidos trata-se de um problema praticamente universal. O antígeno leucocitário humano (HLA) é um importante sistema que participa da resposta imune adaptativa a agentes infecciosos, sendo o principal responsável pela apresentação de antígenos derivados de patógenos a linfócitos T. O HLA é uma molécula extremamente polimórfica e cada tipo específico apresenta maior ou menor afinidade com os antígenos apresentados. O objetivo deste estudo foi determinar o grau de interação do HLA com os peptídeos das 10 principais proteínas antigênicas do HCMV e sua relação com o polimorfismo HLA. A sequência peptídica das proteínas foi obtida da base de dados UniProt e os peptídeos imunogênicos foram testados *in silico* através da predição de ligação de epítomos às moléculas do MHC. Redes neurais artificiais foram exploradas na ferramenta do website Immune Epitope Database para o cálculo do grau de afinidade (Ic50) dos 27 tipos de HLAs do tipo I quando testados com as 10 proteínas. As afinidades dos peptídeos foram classificadas por Ic50 em alta (<50 nM), média (50-500 nM) e baixa (> 500 nM). A maioria dos peptídeos previstos (98,30%, variando de 82,3% a 99,7% para as 10 proteínas) foram de baixa afinidade, com pouca chance de interagir com os HLAs. Em média, 0,41 peptídeos mostram alta afinidade de Ic50 com alguns HLAs. Quando classificado pelo número de peptídeos imunogênicos (Ic50 abaixo de 500 nM), a UL48 (maior) foi a mais imunogênica seguido por UL55, UL29, UL32, UL28, Pp65 (mais estudada), UL122, UL123, US3, US32. Essas análises revelaram que alguns HLA são ótimos para apresentar epítomos de HCMV, como A*02:03, A*02:06, A*31:01, A*68:01; enquanto outros são maus apresentadores como A*01:01, A*26:01, B*51:01, B*44:02. O HLA A *02:03 foi o melhor HLA para responder contra os peptídeos do HCMV que exibem níveis elevados de interação com todos os peptídeos da proteína, exceto o US32. Em contraste, os HLAs A*26:01, A*01:01, B*51:01 foram os piores HLAs a apresentar peptídeos de HCMV, exibindo nenhuma ou pouca interação com peptídeos previstos de todas as proteínas. No contexto

clínico, conhecer a interação entre os HLAs e as proteínas do HCMV, pode ajudar a inferir o risco de infecção viral no pós-transplante.

Palavras-chave: Citomegalovirus, proteínas virais e HLA

ABSTRACT

Cytomegalovirus (HCMV) is a common human herpesvirus mostly asymptomatic in immunocompetent population. In immunosuppression, as transplantation, HCMV can reactivate and affect transplant outcome, causing changes in clinical status. HLA is an important system that participates in antigen presentation and T cell activation, which imposes important barrier to transplantation. Matches between HLA guides donor-receptor compatibility. We asked if different HLA would be associated with resistance to HCMV. We chose 10 most immunogenic HCMV proteins related to CD8+ response. The proteins sequence was taken from UniProt Database and immunogenic peptides for MHC-I were predicted by *T Cell Epitopes MHC binding Prediction* using Artificial Neural Networks to calculate predicted Ic_{50} at Immune Epitope Database website against 27 types of I HLAs. The peptides affinities were classified by Ic_{50} into high (<50 nM), medium (50-500 nM) and low (>500 nM). The majority of predicted peptides (98.30%, varying 82.3% to 99.7% for the 10 proteins) were low affinity with little chance to interact with HLAs. On average, 0.41 peptides show high affinity Ic_{50} in the HLA. When classified by the number of immunogenic peptides (Ic_{50} below 500 nM), UL48 (biggest) were found to be the most immunogenic followed by UL55, UL29, UL32, UL28, Pp65 (most studied), UL122, UL123, US3, US32. These analyses revealed that some HLA are optimal to present HCMV epitopes, as A*02:03, A*02:06, A*31:01, A*68:01; while others are poor presenters as A*01:01, A*26:01, B*51:01, B*44:02. HLA A*02:03 was the best HLA to respond against HCMV peptides displaying high levels of interaction with all protein peptides but US32. In contrast HLA A*26:01, A*01:01, B*51:01 were the worst HLAs to presents HCMV peptides displaying none or just few interactions with predicted peptides from all proteins. Clinical context, knowing the interaction between the HLAs and HCMV proteins might help infer the risk of virus infection on post transplantation.

Keywords: Cytomegalovirus, viral proteins, HLA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Componentes da sinalização celular entre TCR e MHC no momento da sinapse imunológica. (Adaptado de vídeo)	15
Figura 2. Estrutura do HCMV e suas divisões	20
Figura 3. Estrutura da molécula de HLA classe I.....	20

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico. 1 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína UL48.....	30
Gráfico. 2 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína UL32	30
Gráfico. 3 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína UL122.....	30
Gráfico. 4 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína UL55.....	31
Gráfico. 5 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína UL29.	31
Gráfico. 6 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína pp65	32
Gráfico. 7 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína UL123.....	32
Gráfico. 8 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína UL28.	33
Gráfico. 9 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína US3.....	33
Gráfico. 10 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína US32.	34
Gráfico. 11 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína UL32.....	34
Gráfico. 12 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína UL48.....	35
Gráfico. 13 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína UL122.....	35

Gráfico. 14 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína UL55.....	36
Gráfico. 15 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína pp65.	36
Gráfico. 16 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína UL29.....	37
Gráfico. 17 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína UL28.....	37
Gráfico. 18 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína UL123.....	38
Gráfico. 19 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína US3	38
Gráfico. 20 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína US32.	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ação de proteínas do HCMV na resposta imunológica.....	17
Tabela 2. Ferramentas de predição de epítipo para linfócitos T disponíveis	24
Tabela 3. Proteínas do HCMV e suas afinidades aos HLAs	29
Tabela 4. HLAs predominantes em interações fracas e fortes de acordo com a proteína	40
Tabela 5. Sequência das 10 proteínas do HCMV	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidade Dependente de Anticorpos
ANN	Rede Neural Artificial
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
ELISA	Imunoensaio Enzimático
gB	Glicoproteína B
gH	Glicoproteína H
HCMV	Citomegalovírus Humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IEDB	Immuno Epitope Data Base
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina H
IMPAR	Laboratório de Immunoparasitologia
MBL	Lectina Ligadora de Manose
MHC	Complexo Maior da Histocompatibilidade
PSSMs	Matriz de Pontuação Específica de Posição
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
TCR	Receptor de Linfócito T
TLR-2	Receptor Toll do Tipo 2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Citomegalovírus	14
1.1.1 Características virais e imunológicas	14
1.1.2 Clínica	17
1.1.3 Diagnóstico	18
1.1.4 Tratamento	19
1.2 HLA	19
1.2.1 Sinalização complexo HLA de classe I e TCR	21
1.3 Análise de imunogenicidade global por bioinformática	22
2. OBJETIVO GERAL	26
2.1 Objetivos Específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Revisão sistemática da literatura	26
3.2 Determinação da sequência peptídica das principais proteínas imunogênicas do HCMV	27
3.3 Escolha dos HLA classe I	27
3.4 Avaliação de diferentes ferramentas de predição de afinidade HLA-epítipo...27	
4. RESULTADOS	28
4.1. Principais proteínas imunogênicas do HCMV e suas características.....	28
4.2 Interação do HLA com as proteínas do HCMV	30
4.3 Alta e intermediária afinidade dos HLAs por cada proteína	35
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO.....	44
7. REFERÊNCIAS.....	45
8. ANEXOS	49

1. INTRODUÇÃO

1.1 Citomegalovírus

1.1.1 Características virais e imunológicas

O Citomegalovírus humano (HCMV) é o maior vírus pertencente à classe dos herpesvírus humanos, da família *Herpesviridae*. O seu tamanho é de aproximadamente 230,000pb, codifica cerca de 170 até 750 proteínas e, as propriedades do genoma desse vírus possibilitam a existência de uma diversidade nos padrões de infecção ao hospedeiro (28; 8).

Após a infecção primária pelo HCMV a replicação do DNA viral ocorre entre 12-24 horas e é distribuída em 3 etapas: produção de proteínas regulatórias, produção da DNA polimerase viral, proteínas estruturais e por último, montagem dos vírions. Ao entrar na célula alvo do hospedeiro através dos receptores superfície celular, libera seu DNA, que é direcionado ao núcleo para início do processo de síntese das proteínas virais. Após este período de replicação, o vírus pode entrar em latência ou continuar sua replicação, liberando novos vírions no sangue e em outros fluidos corporais (19).

O tropismo celular do HCMV pode ser variado, devido a sua variabilidade genética, pode se direcionar a diferentes tipos celulares. Receptores específicos como a molécula de adesão intercelular específica de célula dendrítica (DC-SIGN), receptor do fator de crescimento (EGFR) e CD13 são citadas como participantes no processo de infecção pelo vírus (9; 29).

Receptores inespecíficos como sulfato de heparano e anexina II interagem com as glicoproteínas virais B e H (gB e gH) e outros complexos glicoproteicos do HCMV, mediando a interação do vírus com as células do hospedeiro. Esses complexos glicoproteicos que são responsáveis pela entrada do vírus nas células endoteliais, células dendríticas e macrófagos (3; 4; 26).

A transmissão do HCMV ocorre após contato com líquidos biológicos contaminados, como: saliva, sêmen, secreção vaginal, urina, via placentária, transfusão sanguínea e

transplante de órgãos (9). Matos e colaboradores (19) reforçaram em seu estudo que apesar das variadas formas de transmissão que aumentam a incidência da infecção, o HCMV pode ser inativado por fatores físico-químicos, ou seja, lavagem das mãos com detergentes e medidas de higiene podem inativar o vírus pela degradação de seu envelope lipídico.

A infecção por HCMV é muito prevalente na população. Segundo estudo realizado por Junqueira (14) em algumas regiões do Brasil, entre 30% a 90% dos adultos saudáveis apresentaram anticorpos IgG-HCMV.

No ciclo viral do HCMV, tanto o ciclo lítico quanto o lisogênico pode ser escolhido pelo vírus. As células preferencialmente acometidas pela latência são as células endoteliais, células progenitoras hematopoiéticas CD34+, monócitos e macrófagos. No caso de transmissão e infecção advindas de enxertos transplantados, as células endoteliais vasculares, que estão presentes em maior quantidade nos tecidos são as mais acometidas pelo vírus, e também são as células mais envolvidas nos mecanismos de rejeição (27;16).

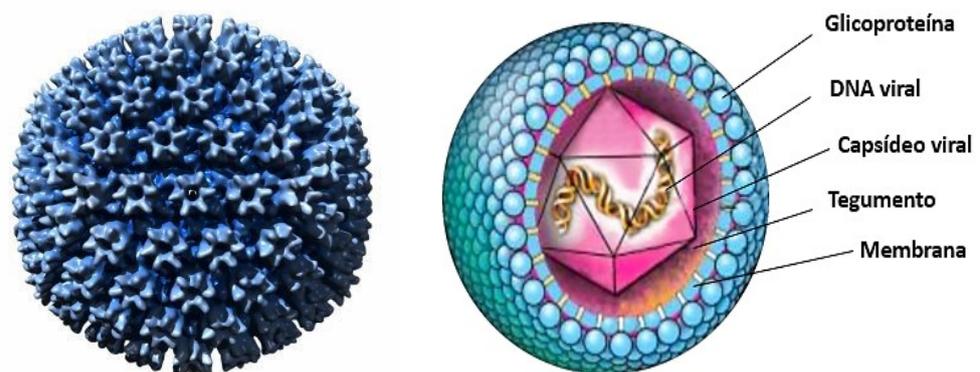


Figura 1. Estrutura do HCMV e suas divisões
(Adaptado de [https://www.nist.gov/ structure-HCMV-genome](https://www.nist.gov/structure-HCMV-genome))

Resposta imunológica ao HCMV

Entre manter-se latente ou prosseguir para uma reativação, o vírus precisa responder às mudanças no indivíduo, por isso, a sinalização celular é determinante no comportamento do vírus. O genoma viral é regulado por fatores de transcrição do hospedeiro, levando a mudanças no estado de ativação em diferentes tipos celulares, alguns desses fatores são NF-kB e o GATA-2 (8; 30; 6; 25).

O início da resposta imune inata interage com a resposta adaptativa, com consequente ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs), aumento na expressão celular do HLA, de moléculas coestimulatórias, quimiocinas e citocinas como IL-6, IL-12 e IL-23 (15).

A inflamação e a reativação do vírus são mediadas por citocinas como TNF-alfa, liberados pela via NF-kB nas células. Essa citocina estimula a atividade de proteínas iniciadoras na região promotora do gene nas células infectadas, estimulando replicação e levando à reativação do vírus. (12)

O HCMV possui ligantes reconhecidos por Toll Like Receptors 2 (TLR-2) em monócitos e macrófagos, e a sinalização promovida ativa mecanismos inatos como: fagocitose, autofagia, regulação de citocinas (IL-6 e TNF-alfa) e quimiocinas (CCL2) pró-inflamatórias, favorecendo o recrutamento de leucócitos (3; 15).

Entre as células responsáveis pela imunidade inata, as NKs (CD56+) tornam-se maduras e desempenham papel importante na infecção por HCMV, produzindo IFN γ com a intenção de combater o vírus, e participa do mecanismo de citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC), em que o sistema imune inato e humoral se unem para combater a infecção (6).

O HCMV possui produtos de transcrição gênica que contribuem para evasão ao sistema imune, como proteínas que interferem na apresentação de antígenos virais pelo do HLA de classe I. Outro mecanismo descrito é a inativação da via da lectina ligadora de manose (MBL), uma das vias de ativação da cascata do complemento, assim o vírus tem maior chance de sobrevivência e replicação (20).

No desenvolvimento da resposta adaptativa, a conversão de linfócitos TCD4⁺ naive (CD45RA) para linfócitos de memória (CD45RO) específicos, favorece a ativação, reconhecimento e sobrevivência celular. Porém, no contexto do transplante, a resposta mediada por linfócitos T apesar de sua função efetora contra o vírus, contribui com a lesão no enxerto pelo mecanismo de rejeição (32; 31).

Além disso, a redução na função de células T regulatórias diminui o controle ao dano causado pela inflamação e também, a ação da imunidade heteróloga promove uma reação cruzada entre epítomos do HCMV e do enxerto, que serão reconhecidos pelo HLA (1; 32; 31).

A tabela a seguir é uma adaptação do artigo escrito por Kaminski (15), para o jornal americano de transplante e exemplifica algumas das funções de proteínas do HCMV na resposta imunológica. Além das características já descritas, a ação da proteína HCMV-IL10 proporciona um ambiente anti-inflamatório, facilitando a replicação do vírus e reduzindo alguns dos mecanismos mais importantes na resposta, como apresentação de antígenos e proliferação de linfócitos específicos.

Tabela 1. Ação de proteínas do HCMV na resposta imunológica

Proteína	Gene	Função
IE1-p72	IE1	Inibe o gene estimulador de Interferon
pp65	UL83	Reduz o gene estimulador de Interferon
pp65	UL83	Reduz função da NK
pp65	UL83	Inibe expressão do MHCII
HCMV-IL10	UL111	Induz resposta anti-inflamatória, reduz expressão de MHCs nas APCs e estimulação de linfócitos pelas células dendríticas
vICA	UL36	Inibe apoptose extrínseca
vMIA	UL37	Inibe apoptose intrínseca
gpUS2	US2	Degradação MHC I e II
gpUS6	US6	Inibe a TAP

1.1.2 Clínica

O HCMV é um vírus com alta prevalência e infecta aproximadamente 60% - 90% dos adultos na população mundial. A infecção em imunocompetentes consegue ser

controlada pelo sistema imune, quando há manifestação de sintomas, compreende apenas 10% dos saudáveis (37).

Os sintomas da infecção e doença pelo HCMV variam de acordo com o estado imunológico do paciente. Quando sintomática, a doença em pacientes imunocompetentes se apresenta clinicamente com febre aguda, astenia, mialgia, leucopenia, cefaleia, indisposição e em casos raros, adenopatia, desordens gastrintestinais e nervosas (21).

Porém, o vírus é considerado um sério problema de saúde em alguns países, causando morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos, como portadores do HIV, transplantados, e em recém-nascido portador da infecção congênita provocada pelo vírus. Devido a condição imunológica desfavorável desses indivíduos, os mecanismos de sobrevivência e replicação do vírus favorecem a manifestação mais exacerbada de complicações e sintomas (35).

1.1.3 Diagnóstico

Os métodos de diagnóstico para o HCMV baseiam-se em técnicas de sorologia, antigenemia e biologia molecular. A sorologia é realizada por Imunoensaio Enzimático (ELISA) ou quimiluminescência e ambas utilizam o soro do paciente, para detecção de Imunoglobulinas G (IgG) e Imunoglobulinas M (IgM) específicas. A limitação da técnica é a impossibilidade de diferenciação entre reativação, infecção crônica ou reinfeção por uma cepa diferente do vírus (21; 14).

O exame de antigenemia detecta no sangue a proteína viral pp65, (fosfoproteína de 65kD) presente no núcleo dos leucócitos infectados, através de um ensaio de imunofluorescência, caracterizando replicação viral ativa. Essa técnica pode ser muito utilizada no acompanhamento pós-transplante (19).

A técnica de biologia molecular empregada para diagnóstico é a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), qualitativa e quantitativa, de boa especificidade e alta sensibilidade, que utiliza o DNA viral como material de análise e demonstra se

há replicação viral ativa. Essa técnica permite a liberação do resultado em até 6 horas (13).

1.1.4 Tratamento

O tratamento da infecção é realizado com medicamentos antivirais, os mais utilizados são o valganciclovir oral e o ganciclovir intravenoso, que interferem na replicação do vírus e atuam na manifestação dos sintomas. O valganciclovir é recomendado para o tratamento da doença leves à moderadas nos transplantados. O ganciclovir é utilizado para o tratamento de viremias altas e doença grave ou em pacientes com má absorção gastrointestinal (34).

A duração da terapia antiviral é individual e monitorada de acordo com sintomas e carga viral. A monitorização inclui também o cuidado no desenvolvimento de resistência, que poderá interferir em todo o processo de recuperação do paciente (34).

Os indivíduos imunossuprimidos, especificamente os transplantados, podem utilizar o tratamento preemptivo, uma monitorização quinzenal da viremia entre os dias 21 e 180 após o transplante, este é o período de maior prevalência e gravidade da doença. No caso de aumento da viremia o tratamento intravenoso é iniciado com ganciclovir ou valganciclovir. O objetivo deste tratamento é reduzir a exposição do paciente à droga e diminuir o risco de rejeição e doença tardia (21).

1.2 HLA

No genoma humano a região mais variável conhecida é chamada de complexo maior de histocompatibilidade (MHC) ou antígenos leucocitários humanos (HLA), com aproximadamente 4.000kb de comprimento e carrega um grande número de diferentes loci, que codificam genes funcionais. É uma região extremamente polimórfica e responsável por codificar os principais componentes da apresentação de antígenos na superfície celular, as moléculas que acomodam fragmentos de proteínas (peptídeos) derivadas de patógenos, para que possam ser reconhecidos pelos linfócitos T e iniciar a resposta adaptativa (38).

O sistema HLA foi descrito por J. Dausset, em 1958, em um trabalho que lhe rendeu o Prêmio Nobel, em 1980. Esses genes estão dispostos em três regiões ou classes genômicas. A região mais distante corresponde ao MHC de classe I, que contém os genes que codificam as cadeias pesadas clássicas (1a) HLA- A, -B, e -C. Um alto grau de polimorfismo caracteriza esses genes (2.735 alelos nos loci em HLA-A, 3.455 alelos em HLA-B e 2.259 alelos em HLA-C) e a maioria desses alelos é funcional (39).

O HLA classe I possui duas cadeias polipeptídicas, uma alfa e uma beta. Como

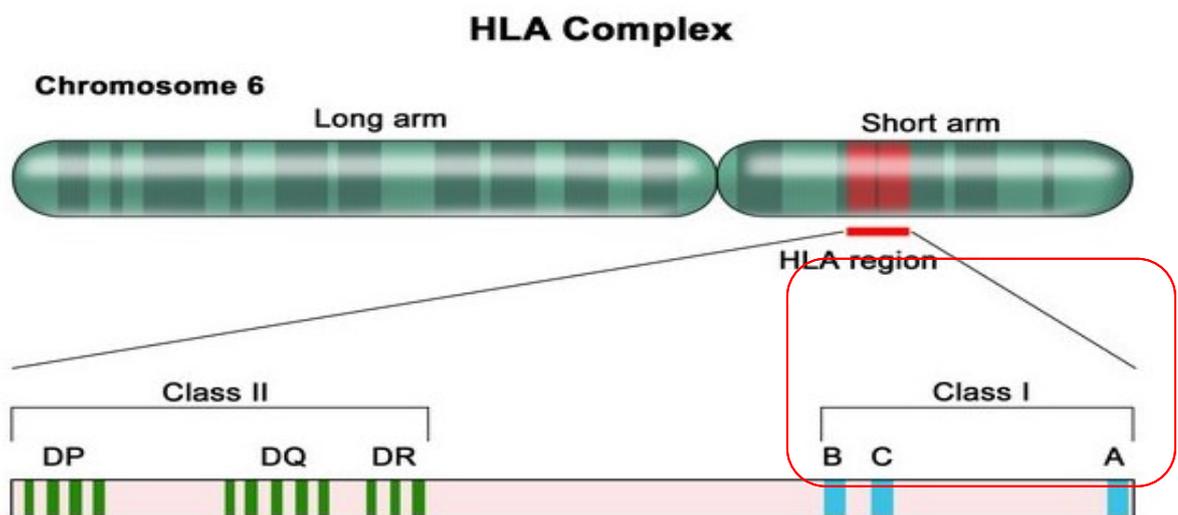


Figura 2. Localização do complexo HLA no braço curto do cromossomo 6.

mostrado na figura X, a cadeia alfa possui 5 domínios: 2 de ligação peptídica (α_1 e α_2), 1 de imunoglobulina, uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática e são expressos por todas as células nucleadas. (11).

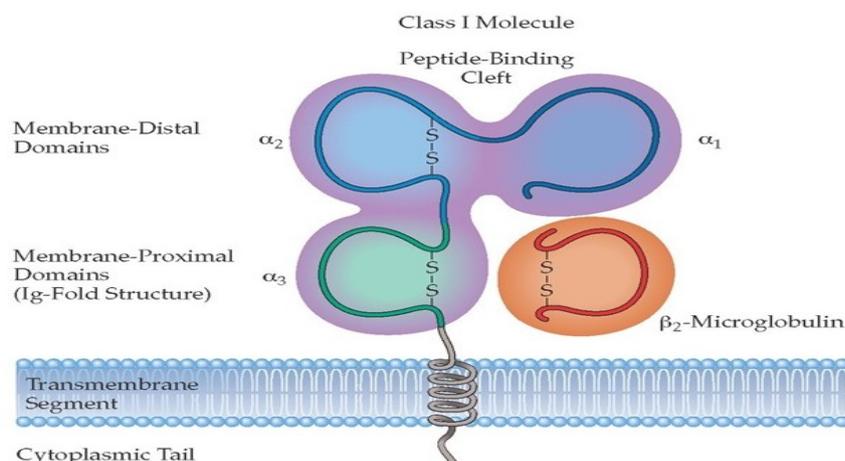


Figura 3. Estrutura da molécula de HLA classe I

Os genes constituintes do HLA, além da função de apresentação de antígenos, estão diretamente ligados à imunologia dos transplantes, uma vez que estas proteínas polimórficas são os principais alvos da resposta imune do receptor, que também facilita a rejeição celular e humoral ao enxerto (23).

1.2.1 Sinalização complexo HLA de classe I e TCR

Os antígenos exógenos apresentados pelas moléculas do HLA classe I para o reconhecimento por linfócitos T específicos podem ser produtos de vírus, bactérias ou outros micro-organismos intracelulares que infectam as células. Em células tumorais, genes mutados ou superexpressados podem produzir antígenos de proteínas, que são reconhecidas por CTLs CD8+ restritas à classe I (40).

Os epítomos de proteínas que provocam as respostas são os peptídeos gerados por proteólise em APCs e se ligam com maior avidéz aos aminoácidos presentes no arcabouço de ligação das moléculas do HLA. Esses antígenos são reconhecidos pelos linfócitos CTLs CD8+, que destroem por meio de seus mecanismos citotóxicos as células que produzem os antígenos intracelulares (40).

Uma variedade de peptídeos de proteínas naturais é produzida, e apenas alguns destes peptídeos possuem características que lhes permitem ligar-se às moléculas do HLA presentes em cada indivíduo. Assim, as proteínas são monitoradas pela via de processamento de antígenos, e os peptídeos derivados tanto de proteínas próprias normais como de proteínas estranhas são apresentadas por moléculas do HLA para a vigilância por linfócitos T (5).

A especificidade do linfócito T para antígenos é definida por seu receptor de célula T (TCR) acoplado ao complexo CD3, que o auxilia no reconhecimento de antígenos apresentados. Cada clone de células T *naive* através do TCR encontra ligantes antigênicos, como os fragmentos ligados ao HLA de classe I. O TCR também é exposto a peptídeos próprios, para seleção positiva durante o seu desenvolvimento no timo, e sobrevivência periférica (5).

Os co-receptores do TCR, CD8 (HLA I) ligam-se em regiões não polimórficas das moléculas de HLA através de domínios extracelulares. O CD8 apresenta em sua porção citoplasmática, a proteína tirosino quinase dos linfócitos (Lck), localizada próxima do complexo HLA-peptídeo-TCR no momento da sinapse imunológica. Para iniciar a sinalização ocorre a fosforilação da cadeia z (zeta) do CD3, dos imunorreceptores de ativação dependente de tirosina (ITAMs) e da Zap70 (Figura 1) (2).

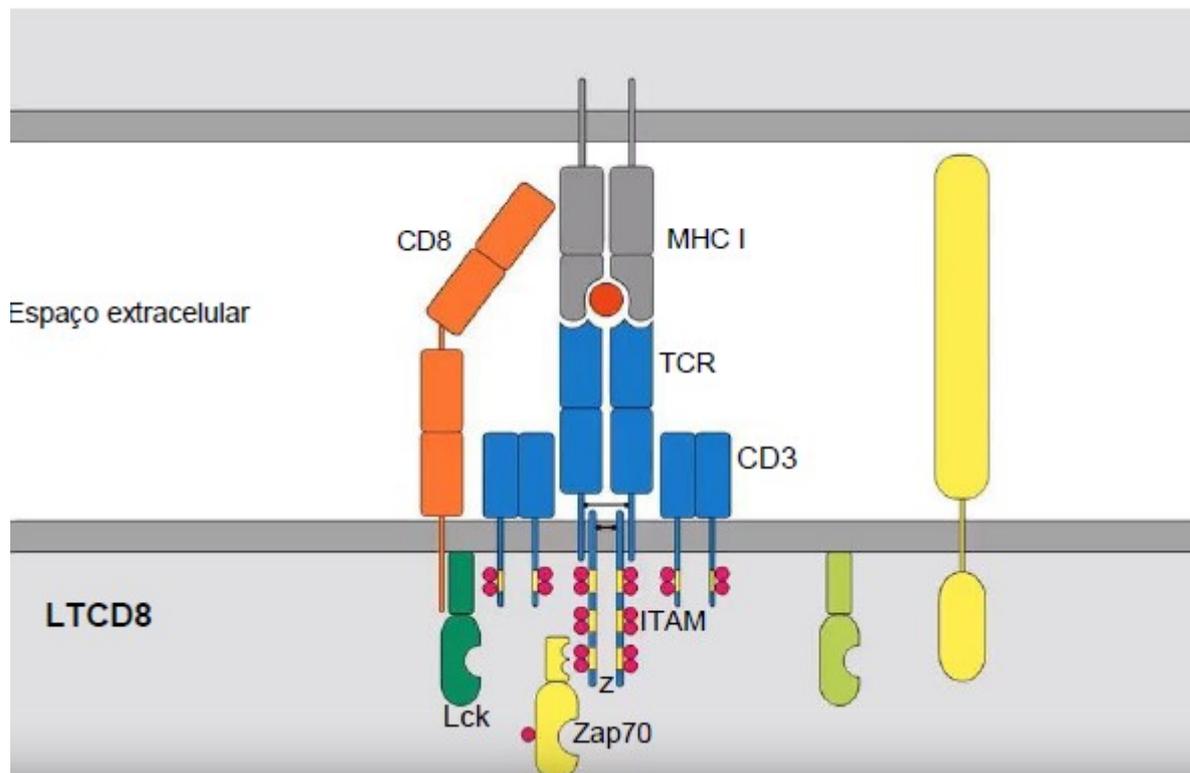


Figura 4. Componentes da sinalização celular entre TCR e MHC no momento da sinapse imunológica. (Adaptado do vídeo “Desenvolvimento dos Linfócitos - Sinalização do TCR”. Disponível em <https://www.youtube.com.br>)

As fosforilações de ITAMs e Lck são necessárias para a sinalização do TCR e ativação da Zap70 que inicia outras vias em sequência, gerando cascatas de reações que possibilitam uma sinalização completa. A atividade das quinases Lck e Zap70 devem impor excelente sensibilidade para o início de uma sinalização celular adequada (2).

1.3 Análise de imunogenicidade global por bioinformática

Os peptídeos que são apresentados pelo HLA de classe I possuem um tamanho de 8-11 aminoácidos, preferencialmente 9 aminoácidos. A formação desses peptídeos ocorre através da degradação da proteína e ação de exonucleases no processamento de antígeno. Por isso, apenas 1 entre diversos fragmentos gerados, será capaz de se ligar corretamente ao MHC para a apresentação ao TCR e posterior sinalização de que a célula precisa entrar em apoptose (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

Devido à seletividade na formação do complexo HLA-antígeno, imunologistas e pesquisadores da área de desenvolvimento de vacinas possuem interesse em identificar quais desses fragmentos de determinados micro-organismos se ligam melhor ao HLA. Não apenas restrita à essas áreas, a predição de epítomos pode também ser utilizada como ferramenta para desenvolvimento de imunoterapias e ferramentas para auxiliar diagnósticos (17).

A diversidade do HLA conta com mais de 1000 alelos diferentes em humanos, que resultam em diferentes interações à epítomos. A existência de epítomos com maior afinidade por HLAs reforça a ideia de que, explorar uma matriz de comparação com todos os aminoácidos de uma proteína pode auxiliar no encontro de um possível peptídeo que terá uma interação de maior afinidade. Diferentes métodos foram criados buscando prever com precisão o grau de afinidade de um peptídeo (18).

Várias técnicas computacionais são utilizadas no âmbito da bioinformática imunológica, como: matrizes de pontuações específicas (PSSMs), amostragem de Gibbs, modelos ocultos de Markov, máquinas vetores de suporte e redes neurais artificiais (ANN). As redes neurais artificiais funcionam como um robô através de uma rede de computador, onde a informação é distribuída em camadas de entrada de informação, camadas ocultas e uma camada de saída da informação, conectadas em uma determinada estrutura através de conexões ponderadas (17). Os modelos de rede neural têm a função de calcular e prever relação entre variáveis, e são aplicados em diferentes áreas como processamento de imagens, detecção de fraudes em setor financeiro, previsão do tempo e diagnóstico clínico (41).

Este método pode ser treinado com informações classificadas como ligante-não-ligante ou informações reais de afinidade. Os métodos mais usados combinam esses tipos de informações com métodos de predição, seja pela média ou pela união de dados obtidos em técnicas distintas, como por exemplo dados com resultantes de interesse (positivo/negativo) retirados de matrizes de pontuações específicas (PSSMs) para integrar à determinado dado de sequência ou afinidade, gerado pela rede neural artificial (22).

Na escolha de qual método de predição utilizar, deve-se atentar para cuidados como o desempenho e avaliar se realmente é possível obter uma resposta adequada daquele determinado conjunto de ferramentas. Um estudo comparativo do desempenho preditivo de grande parte dos métodos disponíveis já foi realizado, mostrando que em geral, os métodos de matriz de pontuação e estabilização (SMM) e rede neural artificial (ANN) apresentam melhor desempenho (24).

Os modelos de estudo permitem gerar um quadro preditivo de cinética, uma abordagem quantitativa é necessária frente à existência de diversas células, moléculas, vias regulatórias e mecanismos de feedback fisiológicos. A presença de características complexas dificulta a interpretação das respostas durante uma doença, ou restabelecimento funcional após tratamentos como quimioterapias ou transplantes, por isso, deve-se contar com boa interpretação e reprodução dos modelos teóricos desenvolvidos e considerar a diversidade do sistema imunológico e condições específicas de cada modelo estruturado (17).

A predição de qual região de determinado patógeno será um melhor epítipo para interagir com o HLA do indivíduo pode auxiliar, além da produção de vacinas, o entendimento de diversas infecções além do HCMV. Os avanços que possibilitam hoje encontrar milhares de micro-organismos sequenciados nos proporciona alternativas na busca de elucidar mecanismos de diversas doenças, contribuindo com a melhora em tratamentos.

Tabela 2. Ferramentas de predição de epítipo para linfócitos T disponíveis

Base de dados	Endereço	Ferramenta
---------------	----------	------------

CTLpred	www.imtech.res.in/raghava/ctlpred	Predição de epítomos para LTC baseado em rede neural artificial
IEDB MHC Class I	www.immuneepitope.org/analyze/	Predição de epítomos MHC I utilizando 3 ferramentas
IEDB MHC Class II	www.immuneepitope.org/tools/matrix/iedb_input	Predição de epítomos MHC II
IEDB Binding	www.immuneepitope.org/analyze/mhc_processing.html	Predição de epítomo para LTCD8+ baseado no IEDB MHC I, ligação da TAP e clivagem de proteassoma
MHCPred	www.jenner.ac.uk/MHCPred	Predição de ligação entre MHC/peptídeo ou TAP/peptídeo por valores de IC50
MHC2Pred	www.imtech.res.in/raghava/mhc2pred	Predição de ligantes promíscuos ao MHCII
NetChop	www.cbs.dtu.dk/services/NetChop	Predição de clivagem do proteassoma/imunoproteassoma
NetCTL	www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL	Predição de supertipos de epítomos, ligação da TAP
PREDEPP	margalit.huji.ac.il	Predição de ligação peptídeo-MHC baseado na estrutura
ProPred	www.imtech.res.in/raghava/propred	Predição de ligação peptídeo-MHCII

Na tabela acima estão algumas ferramentas disponíveis para predição de epítomos para linfócitos T. Muitas bases de dados oferecem além de predições do HLA/MHC e epítomo, predição de todo o processamento de antígeno, como a ação da TAP e do proteassoma. Além disso, alguns deles fornecem predições não apenas para linfócitos T, mas linfócitos B também.

É reconhecida importância da infecção por HCMV em especial em pacientes imunossuprimidos. O principal mecanismo imunológico de defesa a infecções virais é o sistema imune adaptativo. O grau de resposta de um indivíduo a um determinado antígeno é muito variável, na dependência do conjunto de antígenos HLA que suas células expressam. Os métodos farmacológicos atualmente utilizados na profilaxia e tratamento do HCMV apenas permitem uma redução parcial nas taxas de infecção. Torna-se, portanto, necessário o estudo de novas formas de abordagem que permitam prever com eficiência o risco infeccioso, e o grau de resposta imunológica esperada de forma mais individualizada. Neste contexto torna-se necessário e oportuno a

utilização de novas ferramentas de bioinformática como base teórica para o planejamento destas novas propostas.

2. OBJETIVO GERAL

Determinação do grau de interação do HLA com os peptídeos de proteínas antigênicas do HCMV e sua relação com o polimorfismo HLA.

2.1 Objetivos Específicos

2.1.1 - Apresentar as proteínas conhecidamente mais imunogênicas do HCMV.

2.1.2 - Determinar a sequência peptídica das principais proteínas imunogênicas do HCMV.

2.1.3 – Avaliar diferentes ferramentas de predição de afinidade HLA-epítipo.

2.1.4 - Estabelecer um critério de distribuição dos diferentes tipos HLAs e seu grau de afinidade com as proteínas antigênicas do HCMV.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Revisão sistemática da literatura

Para escrita da revisão, a pesquisa dos descritores foi realizada na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e os descritores foram posteriormente encontrados no MeSH terms do PubMed. As “palavras-chave” foram: “Citomegalovirus”, “Infecções por Citomegalovirus”, “HLA”, “antígeno”, “Imunologia de transplantes”, “Infecções oportunistas”, “Elementos de resposta”, “Proteínas virais”, “Rejeição de enxerto”, “Biologia computacional” e “bioinformática”. Os idiomas empregados nesta revisão foram o português e inglês. Os bancos de dados consultados foram o MEDLINE, Scielo, Pub Med e bancos de artigos de universidades federais, como UFMG, UERJ e UFRS.

Os critérios de inclusão basearam-se em artigos e fontes que correlacionam os temas abordados com as palavras-chave relacionadas e dentro dos idiomas limitados. Os critérios de exclusão se basearam em artigos relacionados a outras infecções e artigos que estivessem em outro idioma.

3.2 Determinação da sequência peptídica das principais proteínas imunogênicas do HCMV

Foram escolhidas 10 proteínas do HCMV: UL48, UL55, UL29, UL32, UL28, Pp65, UL122, UL123, US3 e US32. A escolha destas proteínas se baseou no potencial imunogênico, conforme descrito por Sylwester (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Para cada proteína foi realizada a determinação da sequência peptídica por meio do site UniProt o qual disponibiliza e abrange dados de sequência e anotação de proteínas. O resultado desta busca está descrito nos anexos (anexo 1).

3.3 Escolha dos HLA classe I

Para o presente estudo foram selecionados os seguintes HLAs: HLA-A*01:01, A*02:01, A*02:03, A*02:06, A*03:01, A*11:01, A*23:01, A*24:02, A*26:01, A*30:01, A*30:02, A*31:01, A*32:01, A*33:01, A*68:01, A*68:02, HLA-B*07:02, B*08:01, B*15:01, B*35:01, B*40:01, B*44:02, B*44:03, B*51:01, B*53:01, B*57:01 e B*58:01. A escolha foi baseada nos HLAs mais prevalentes de acordo com o Immune Epitope Database (IEDB). Este banco de dados é uma colaboração entre o Instituto Europeu de Bioinformática (EMBL-EBI), o Instituto Suíço de Bioinformática da SIB e o Recurso de Informação sobre Proteínas (PIR). A planilha presente no anexo deste trabalho possui todas as sequências das proteínas utilizadas (anexo 1).

3.4 Avaliação de diferentes ferramentas de predição de afinidade HLA-epítipo

Foram pesquisadas na internet e em artigos com modelos relacionados, as diversas ferramentas para predição de afinidade, e a ferramenta escolhida pertence ao Immune Epitope Database (IEDB), do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas. Esse banco armazena dados que contribuem com a caracterização de anticorpos e epítomos de linfócitos T em humanos, primatas não humanos e outras espécies animais, incluindo epítomos envolvidos em doenças infecciosas, alergia, autoimunidade e transplantes. Além disso, o IEDB também possui ferramentas de predição e análise de epítomos para linfócitos B e processamentos de antígeno, como mencionado na tabela 2.

A sequência peptídica de cada uma das 10 proteínas mais imunogênicas do HCMV para linfócito TCD8+: UL48, UL55, UL29, UL32, UL28, Pp65, UL122, UL123, US3 e

US32 de acordo com Sylwester (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), foram retiradas do UniProt. O programa utilizado para as predições é chamado de *T Cell Epitopes - MHC Binding Prediction*, integrante das ferramentas de predição do IEDB.

A ferramenta *T Cell Epitopes - MHC Binding Prediction* prediz valores de interação calculados por IC50, para ligação de peptídeos em moléculas específicas de MHC nas classes I e II, através do mecanismo de rede neural artificial (ANN).

Dessa forma, cruzamos todas as sequências das proteínas do HCMV com os 27 HLAs mais prevalentes, de acordo com o IEDB. São eles: HLA-A*01:01, A*02:01, A*02:03, A*02:06, A*03:01, A*11:01, A*23:01, A*24:02, A*26:01, A*30:01, A*30:02, A*31:01, A*32:01, A*33:01, A*68:01, A*68:02, HLA-B*07:02, B*08:01, B*15:01, B*35:01, B*40:01, B*44:02, B*44:03, B*51:01, B*53:01, B*57:01 e B*58:01.

Uma planilha com valores de predição é gerada, e através dela, podemos identificar o valor de IC50 para os HLAs em diferentes regiões das proteínas do HCMV. Dessa forma, com o valor e afinidade geral de cada HLA pelas proteínas é possível inferir quais serão os HLAs que interagem melhor com as proteínas do vírus e quais não.

Os gráficos foram feitos utilizando o software GraphPad Prism, os dados de interesse presentes na planilha gerada pela ferramenta do IEDB foram analisados e exportados para este programa, facilitando o agrupamento e visualização dos dados de predição.

As predições realizadas para cada proteína do HCMV geraram resultados que foram dispostos em 2 modelos de gráficos, o primeiro representa uma visão geral de todas as ligações existentes de HLAs em toda extensão de cada proteína. O segundo modelo mostra as ligações feitas por cada HLA em cada uma das 10 proteínas, separadamente.

4. RESULTADOS

4.1. Principais proteínas imunogênicas do HCMV e suas características

A porcentagem presente na tabela de afinidade das proteínas (Tabela 3) está calculada individualmente em cada proteína. A maioria dos epítomos existentes e preditos são de baixa afinidade (98.30%, variando de 82.3% até 99.7% para as 10 proteínas), com poucas chances de interagir com os HLAs. Em média, 0.41 peptídeos mostraram alta afinidade com HLA de acordo com o IC50.

O valor de IC50 é inversamente proporcional à capacidade de ligação, portanto, os valores de 0-50nM são ligações fortes, de 51-500nM ligações intermediárias e acima de 500nM, ligações fracas.

Quando classificamos pelo número de peptídeos imunogênicos de alta e intermediária afinidade, a UL48 é a mais imunogênica, seguida da UL55, UL29, UL32, UL28, pp65, UL122, UL123, US3 e US32. Coincidentemente, a UL48 é a maior proteína do HCMV e a mais imunogênica, mas, isso não se conserva, pois, a segunda maior proteína (UL32) não é, seguida, a mais imunogênica. Portanto, apesar de haver mais possibilidades de ligação, não necessariamente ser maior define a imunogenicidade da proteína.

Tabela 3. Proteínas do HCMV e suas afinidades aos HLAs

Proteína	Tamanho (total aa)	Número total de peptídeos	<50nM Alta afinidade	50-500 nM Afinidade intermediária	>500 nM Baixa afinidade
UL48	2241	120.609	525 (0.43)	1769 (1.46)	118315 (98.1)
UL32	1048	57.005	196 (0.35)	676 (1.20)	56133 (98.4)
UL55	907	49.769	319 (0.65)	985 (2.00)	48465 (97.3)
UL122	580	31.331	115 (0.37)	355 (1.15)	30861 (98.5)
Pp65	561	29.835	149 (0.50)	448 (1.50)	29238 (98.0)
UL29	462	38.304	244 (0.65)	665 (1.77)	37395 (97.5)
UL123	397	26.476	115 (0.44)	360 (1.38)	26001 (98.2)
UL28	272	20.007	164 (0.82)	417 (2.80)	19426 (97.0)
US32	183	1.033	48 (5.64)	134 (15.7)	851 (78.6)
US3	95	96.174	62 (0.06)	217 (0.22)	95895 (99.7)

4.2 Interação do HLA com as proteínas do HCMV

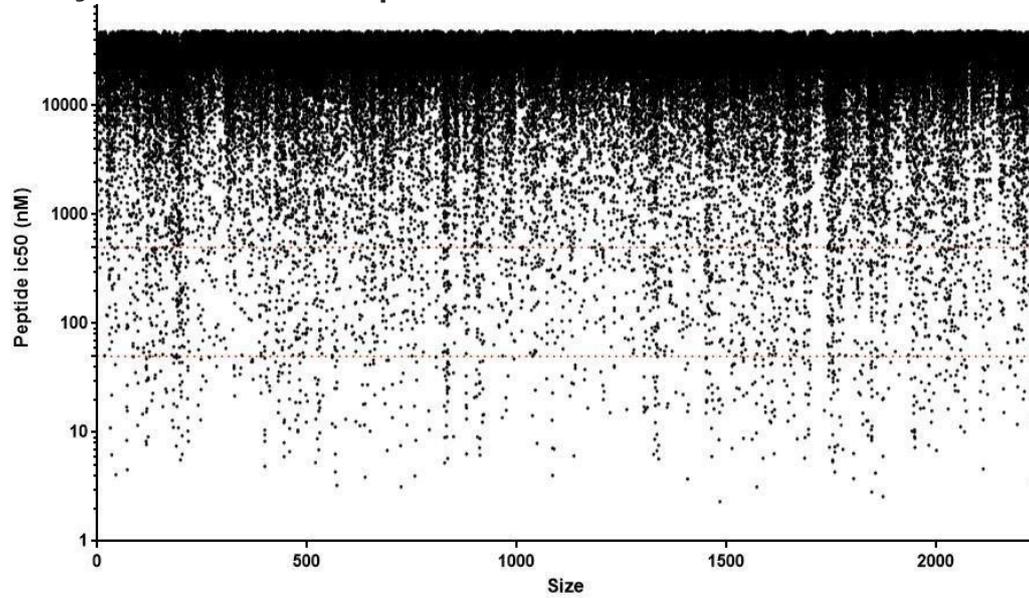


Gráfico. 2 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína UL48. O valor de IC50 é inversamente proporcional, portanto os “spots” localizados na parte inferior do gráfico são de alta afinidade (0-50nM), no meio são os valores de afinidade intermediária (50-500nM) e na parte superior as ligações de baixa afinidade (>500nM).

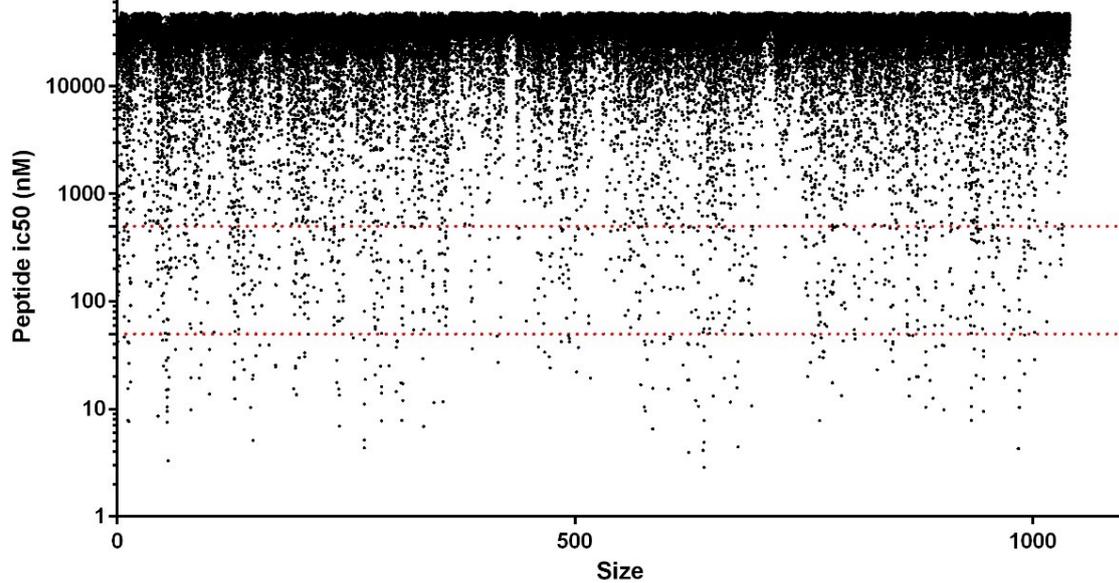


Gráfico. 1 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína UL32. O valor de IC50 é inversamente proporcional, portanto os “spots” localizados na parte inferior do gráfico são de alta afinidade (0-50nM), no meio são os valores de afinidade intermediária (50-500nM) e na parte superior as ligações de baixa afinidade (>500nM).

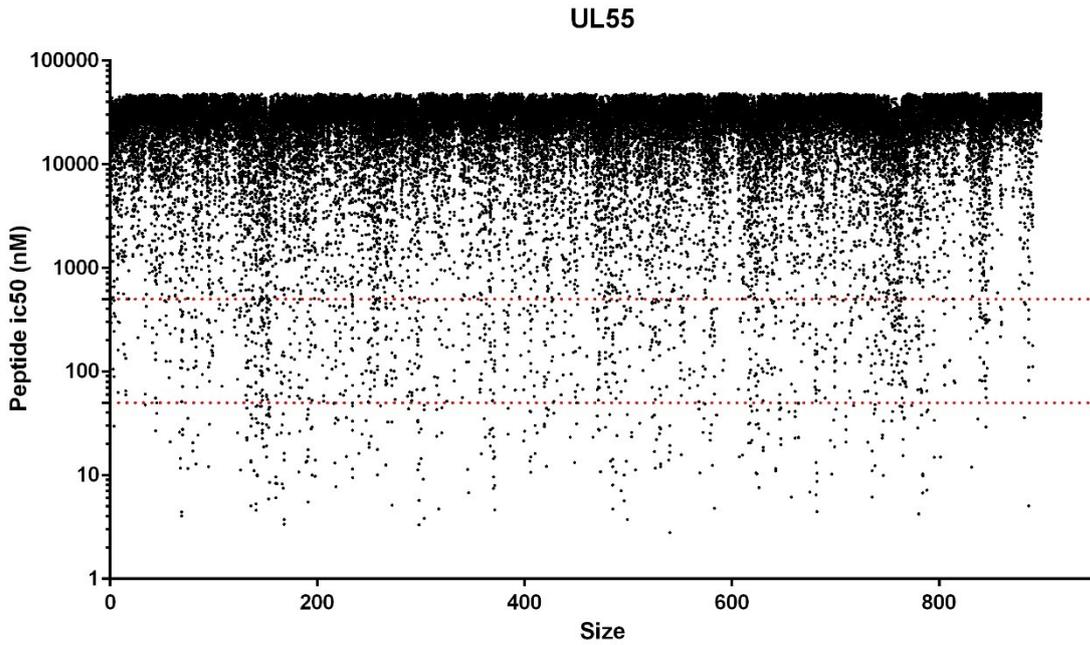


Gráfico. 3 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína UL55. O valor de IC50 é inversamente proporcional, portanto os “spots” localizados na parte inferior do gráfico são de alta afinidade (0-50nM), no meio são os valores de afinidade

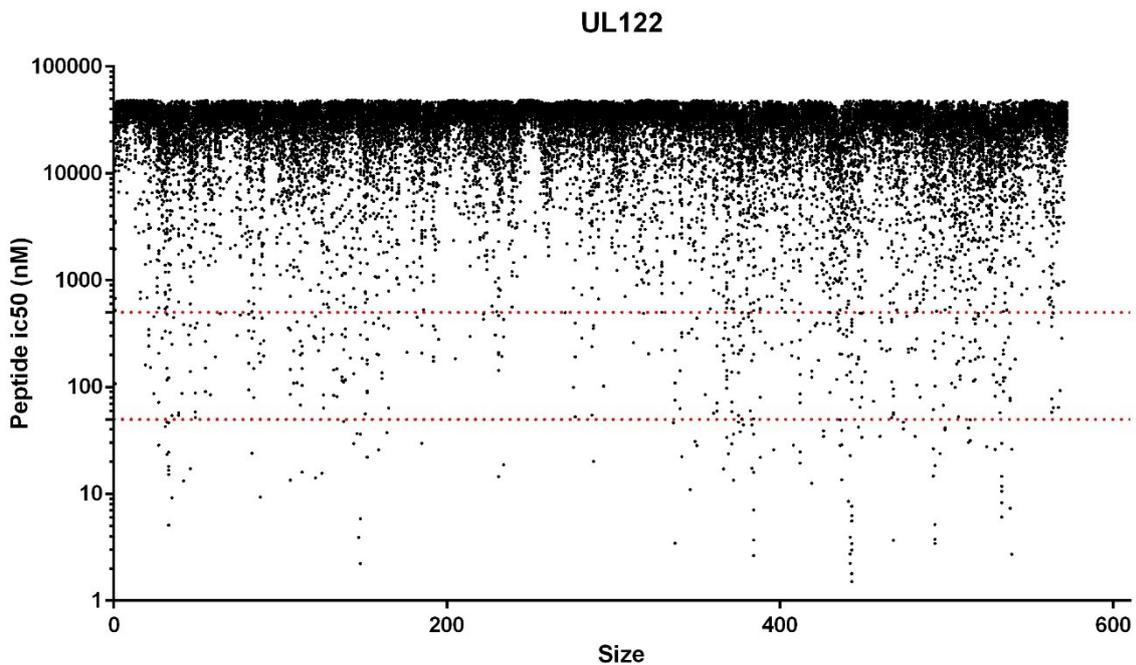


Gráfico. 4 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína UL122. O valor de IC50 é inversamente proporcional, portanto os “spots” localizados na parte inferior do gráfico são de alta afinidade (0-50nM), no meio são os valores de afinidade intermediária (50-500nM) e na parte superior as ligações de baixa afinidade (>500nM).

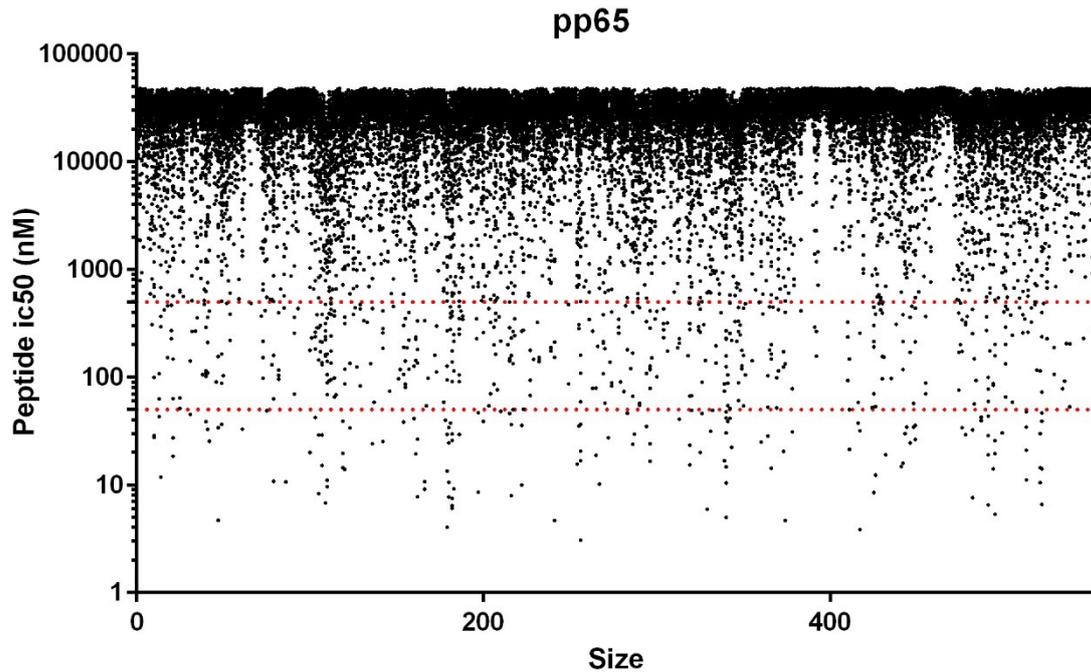


Gráfico. 6 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína pp65. O valor de IC50 é inversamente proporcional, portanto os “spots” localizados na parte inferior do gráfico são de alta afinidade (0-50nM), no meio são os valores de afinidade intermediária (50-500nM) e na parte superior as ligações de baixa afinidade (>500nM).

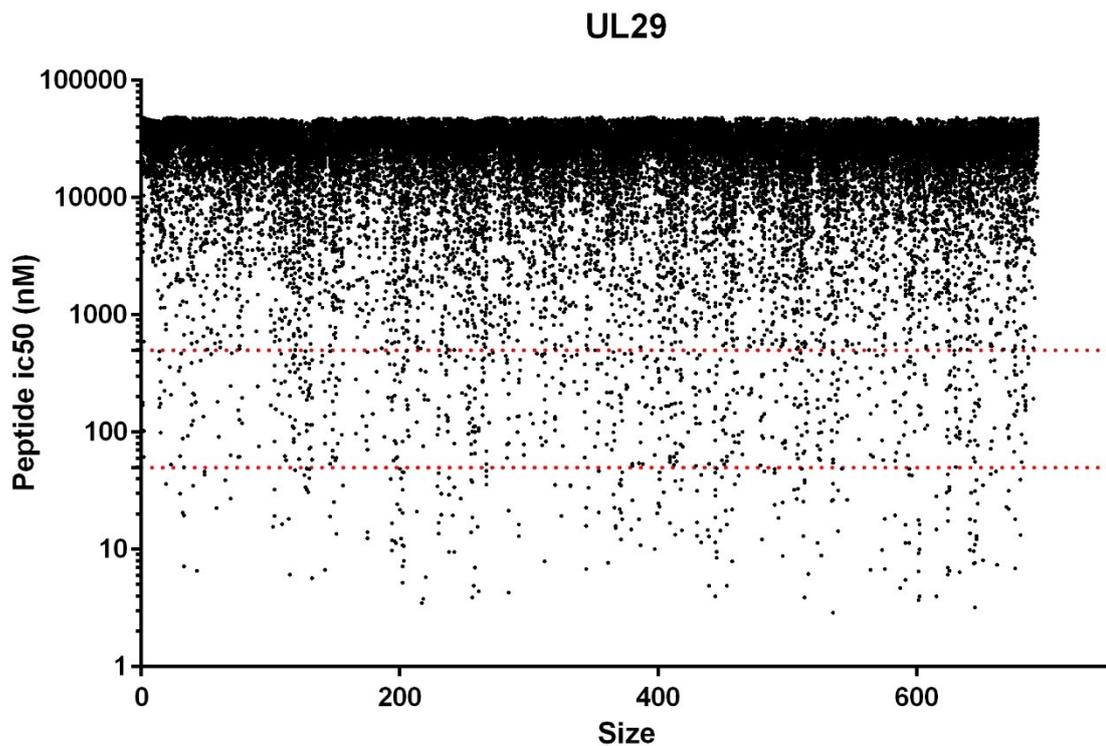


Gráfico. 5 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína UL29. O valor de IC50 é inversamente proporcional, portanto os “spots” localizados na parte inferior do gráfico são de alta afinidade (0-50nM), no meio são os valores de afinidade intermediária (50-500nM) e na parte superior as ligações de baixa afinidade (>500nM).

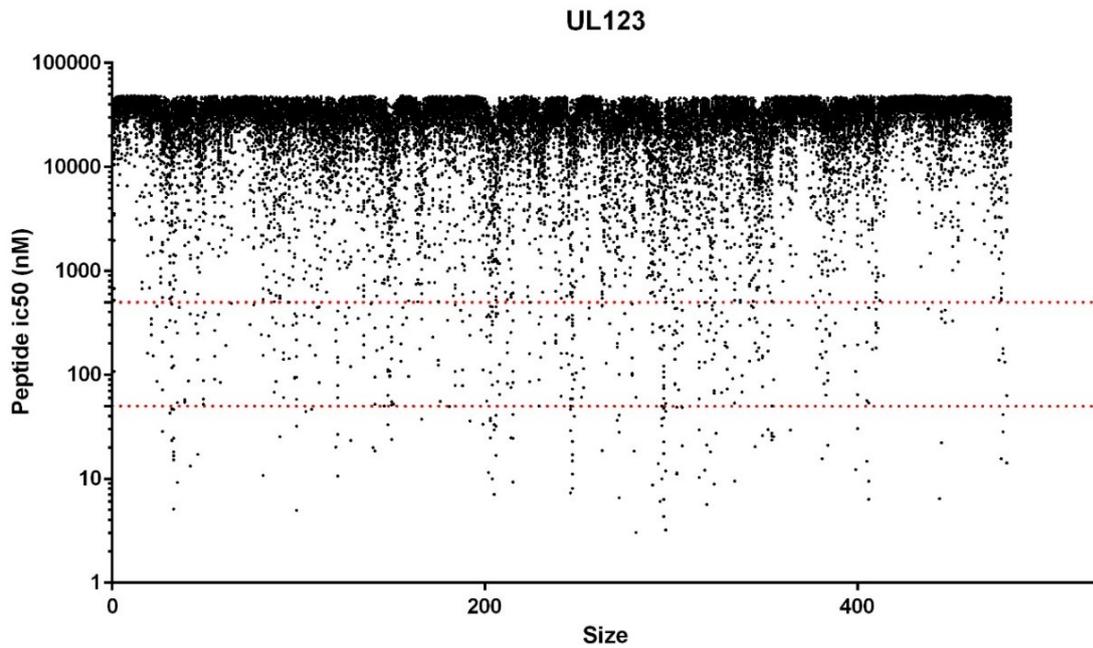


Gráfico. 7 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína UL123. O valor de IC50 é inversamente proporcional, portanto os “spots” localizados na parte inferior do gráfico são de alta afinidade (0-50nM), no meio são os valores de afinidade intermediária (50-500nM) e na parte superior as ligações de baixa afinidade (>500nM).

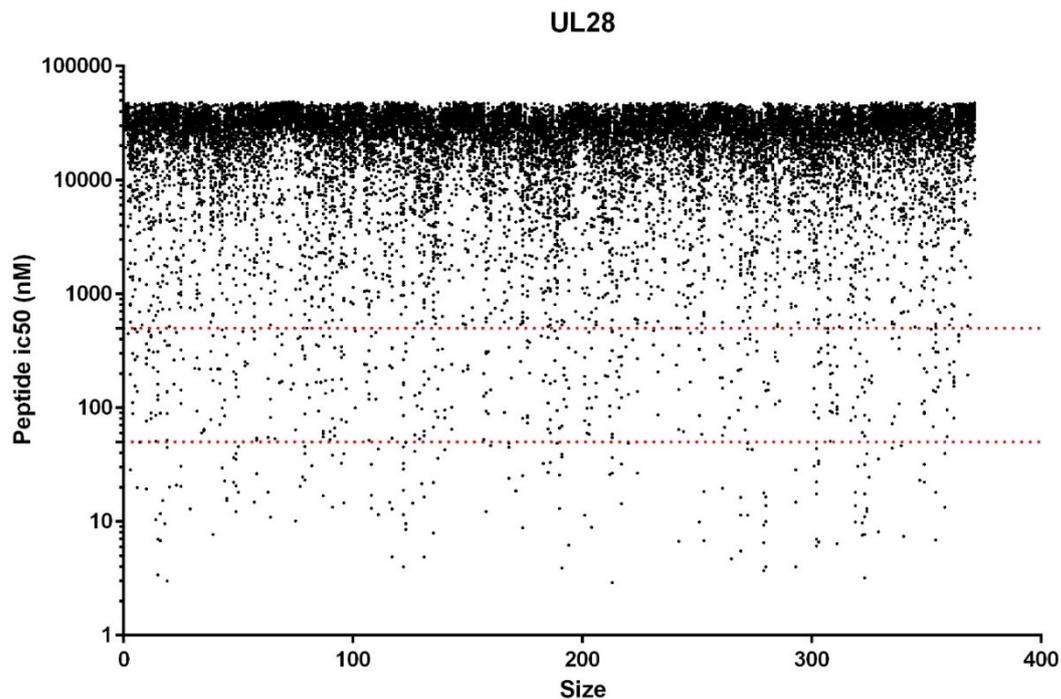


Gráfico. 8 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína UL28. O valor de IC50 é inversamente proporcional, portanto os “spots” localizados na parte inferior do gráfico são de alta afinidade (0-50nM), no meio são os valores de afinidade intermediária (50-500nM) e na parte superior as ligações de baixa afinidade (>500nM)

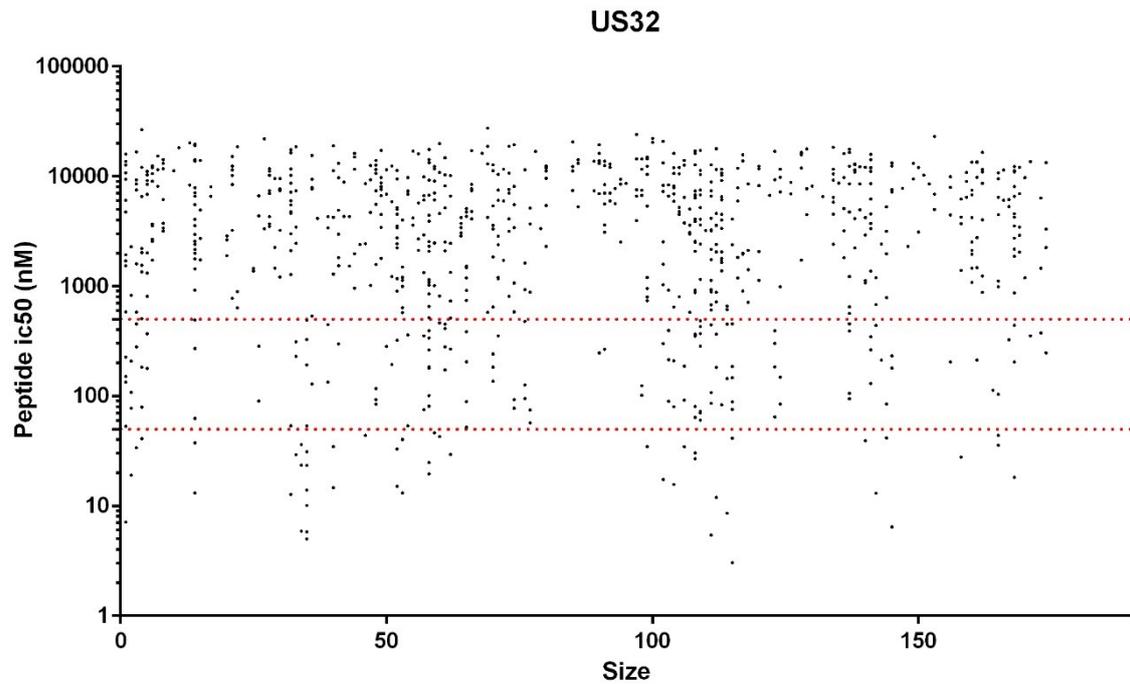


Gráfico. 10 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína US32. O valor de IC50 é inversamente proporcional, portanto os “spots” localizados na parte inferior do gráfico São de alta afinidade (0-50nM), no meio são os valores de afinidade intermediária (50-500nM) e na parte superior as ligações de baixa afinidade (>500nM).

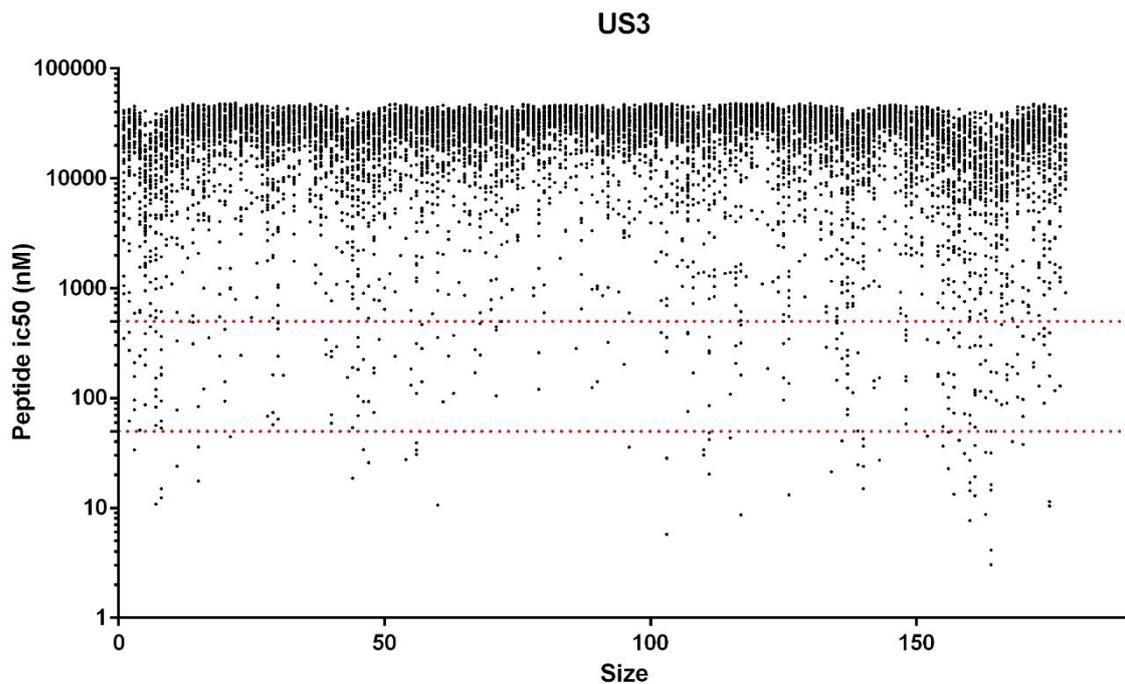


Gráfico. 9 Afinidade geral entre todos os HLAs por toda a extensão da proteína US3. O valor de IC50 é inversamente proporcional, portanto os “spots” localizados na parte inferior do gráfico são de alta afinidade (0-50nM), no meio são os valores de afinidade intermediária (50-500nM) e na parte superior as ligações de baixa afinidade (>500nM).

4.3 Alta e intermediária afinidade dos HLAs por cada proteína

Os gráficos de cada proteína e sua interação de alta e intermediária afinidade com cada um dos 27 HLAs estão dispostos abaixo.

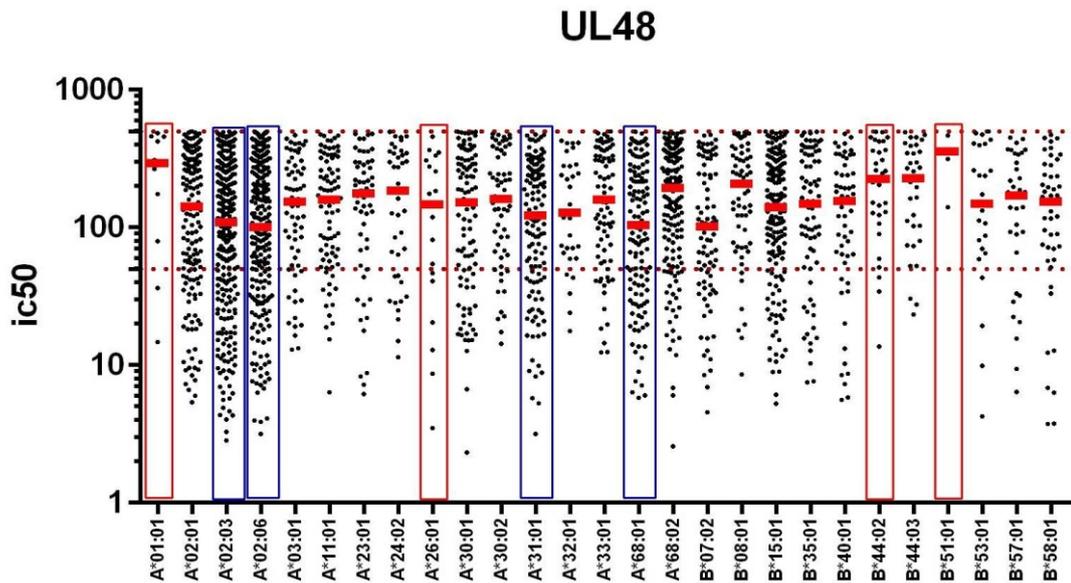


Gráfico. 12 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína UL48. Os retângulos azuis representam os HLAs que mais interagem com a proteína e as vermelhas representam HLAs que menos interagem com a proteína. A parte inferior do gráfico, abaixo da primeira linha vermelha (50nM) estão as ligações de alta afinidade, feitas pelo HLA e entre a primeira e a segunda linha (500nM), estão as ligações de afinidade intermediária.

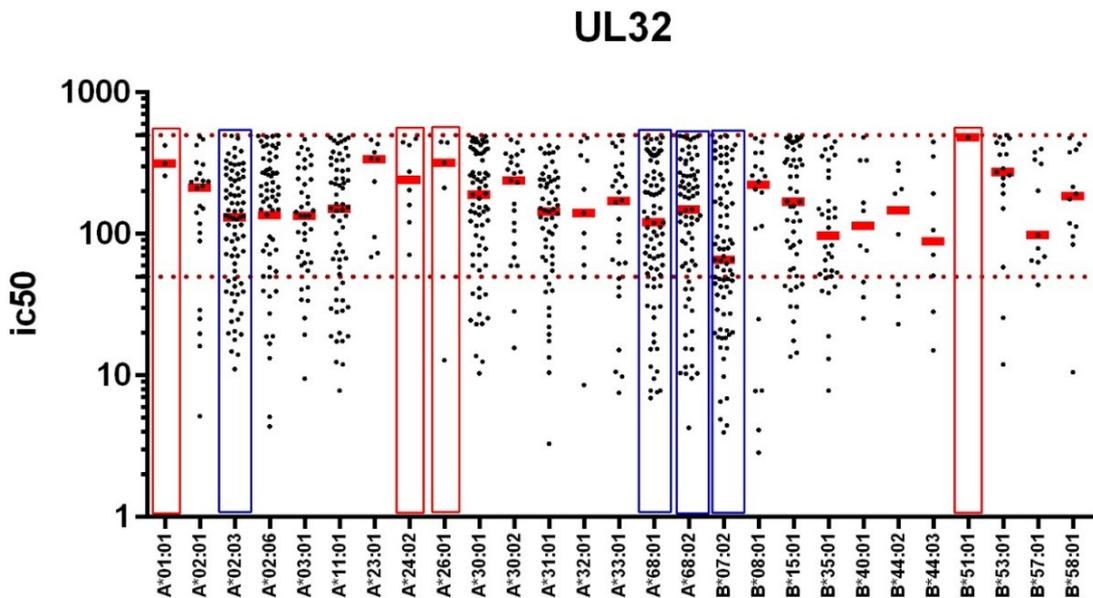


Gráfico. 11 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína UL32. Os retângulos azuis representam os HLAs que mais interagem com a proteína e as vermelhas representam HLAs que menos interagem com a proteína. A parte inferior do gráfico, abaixo da primeira linha vermelha (50nM) estão as ligações de alta afinidade, feitas pelo HLA e entre a primeira e a segunda linha (500nM), estão as ligações de afinidade intermediária.

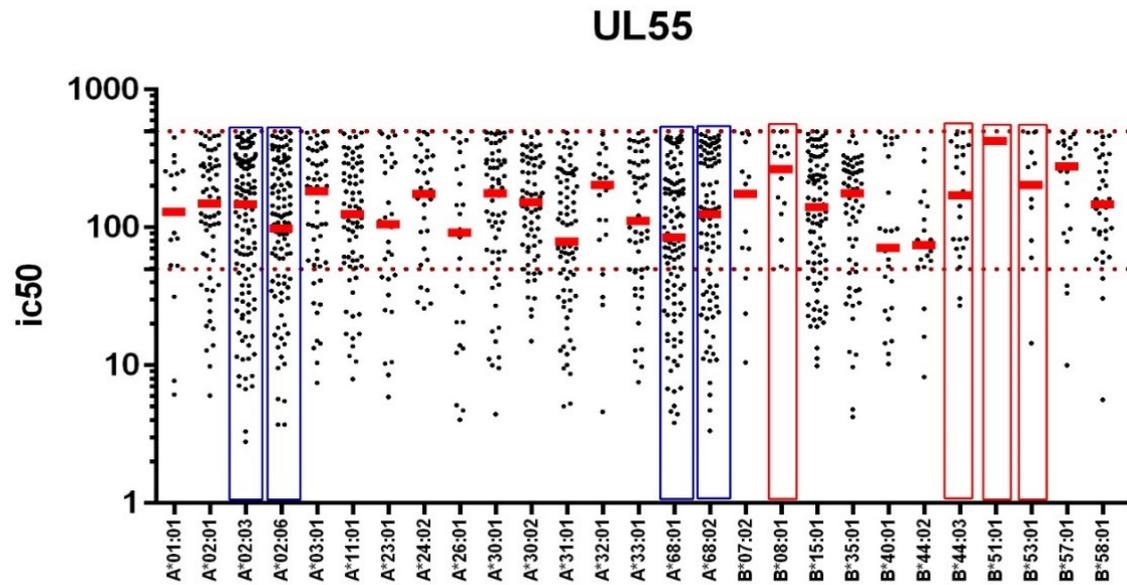


Gráfico. 13 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína UL55. Os retângulos azuis representam os HLAs que mais interagem com a proteína e as vermelhas representam HLAs que menos interagem com a proteína. A parte inferior do gráfico, abaixo da primeira linha vermelha (50nM) estão as ligações de alta afinidade, feitas pelo HLA e entre a primeira e a segunda linha (500nM), estão as ligações de afinidade intermediária.

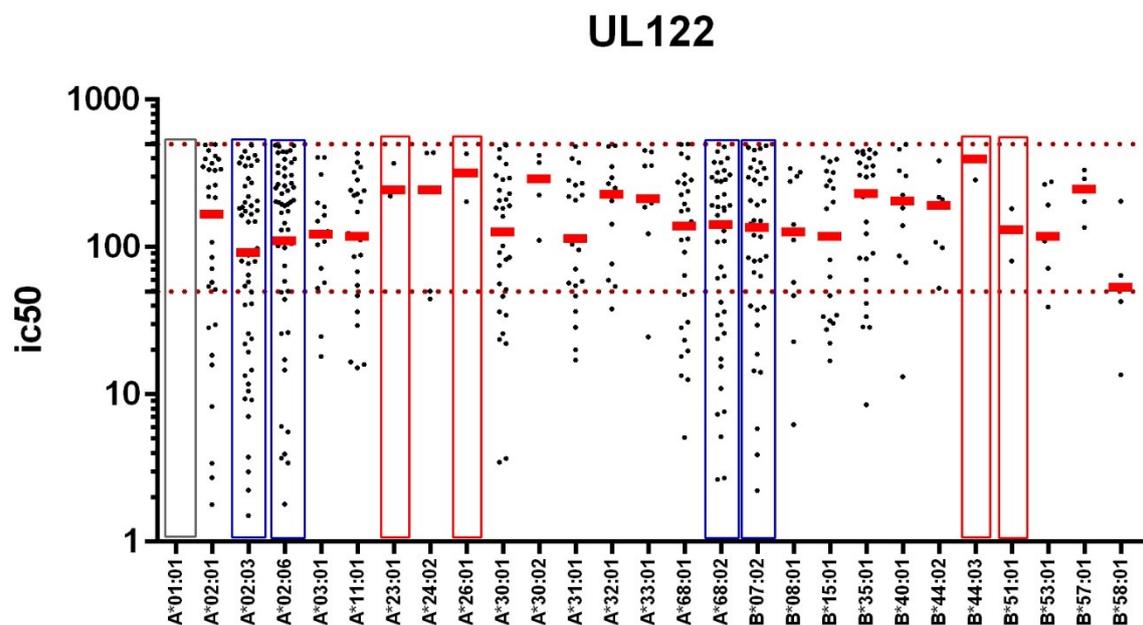


Gráfico. 14 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína UL122. Os retângulos azuis representam os HLAs que mais interagem com a proteína e as vermelhas representam HLAs que menos interagem com a proteína. Os retângulos em cinza destacam HLAs que não apresentaram interações de alta ou intermediária afinidade. A parte inferior do gráfico, abaixo da primeira linha vermelha (50nM) estão as ligações de alta afinidade, feitas pelo HLA e entre a primeira e a segunda linha (500nM), estão as ligações de afinidade intermediária.

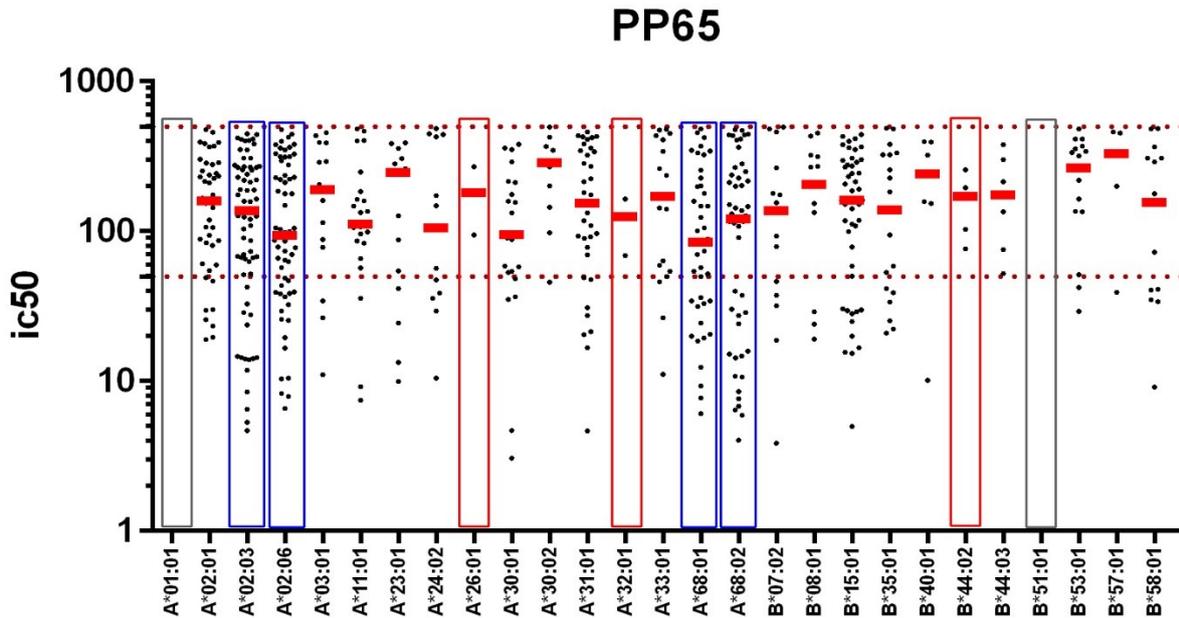


Gráfico. 15. Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína pp65. Os retângulos azuis representam os HLAs que mais interagem com a proteína e as vermelhas representam HLAs que menos interagem com a proteína. Os retângulos em cinza destacam HLAs que não apresentaram interações de alta ou intermediária afinidade. A parte inferior do gráfico, abaixo da primeira linha vermelha (50nM) estão as ligações de alta afinidade, feitas pelo HLA e entre a primeira e a segunda linha (500nM), estão as ligações de afinidade intermediária.

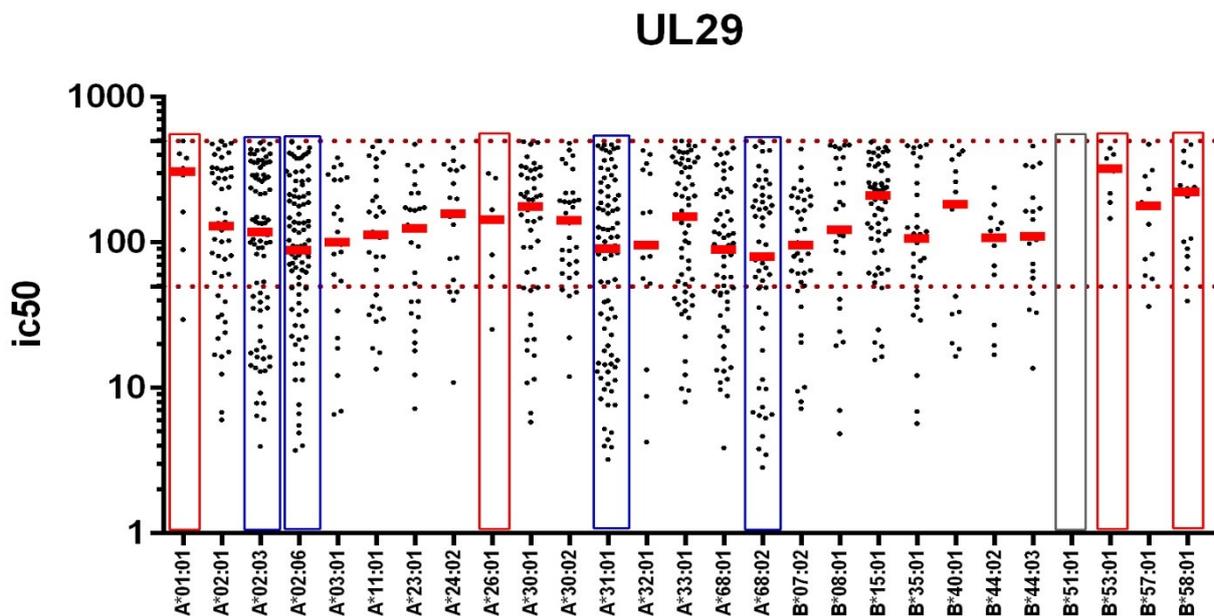


Gráfico. 16. Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína UL29. Os retângulos azuis representam os HLAs que mais interagem com a proteína e as vermelhas representam HLAs que menos interagem com a proteína. Os retângulos em cinza destacam HLAs que não apresentaram interações de alta ou intermediária afinidade. A parte inferior do gráfico, abaixo da primeira linha vermelha (50nM) estão as ligações de alta afinidade, feitas pelo HLA e entre a primeira e a segunda linha (500nM), estão as ligações de afinidade intermediária.

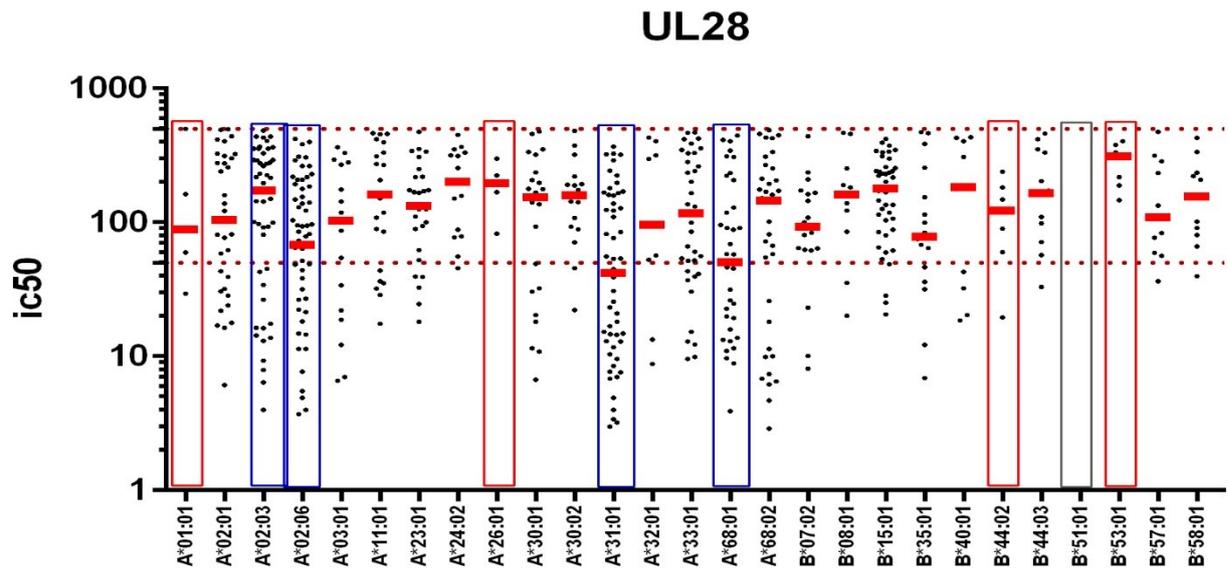


Gráfico. 17 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína UL123. Os retângulos azuis representam os HLAs que mais interagem com a proteína e as vermelhas representam HLAs que menos interagem com a proteína. Os retângulos em cinza destacam HLAs que não apresentaram interações de alta ou intermediária afinidade. A parte inferior do gráfico, abaixo da primeira linha vermelha (50nM) estão as ligações de alta afinidade, feitas pelo HLA e entre a primeira e a segunda linha (500nM), estão as ligações de afinidade intermediária.

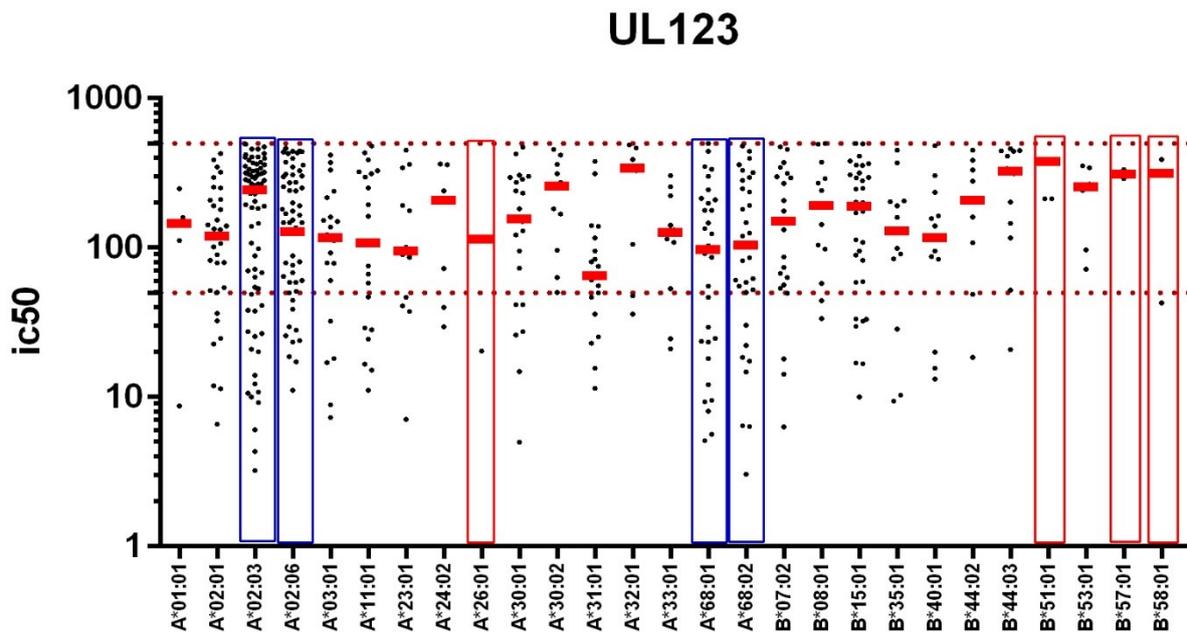


Gráfico. 18 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína UL28. Os retângulos azuis representam os HLAs que mais interagem com a proteína e as vermelhas representam HLAs que menos interagem com a proteína. A parte inferior do gráfico, abaixo da primeira linha vermelha (50nM) estão as ligações de alta afinidade, feitas pelo HLA e entre a primeira e a segunda linha (500nM), estão as ligações de afinidade intermediária.

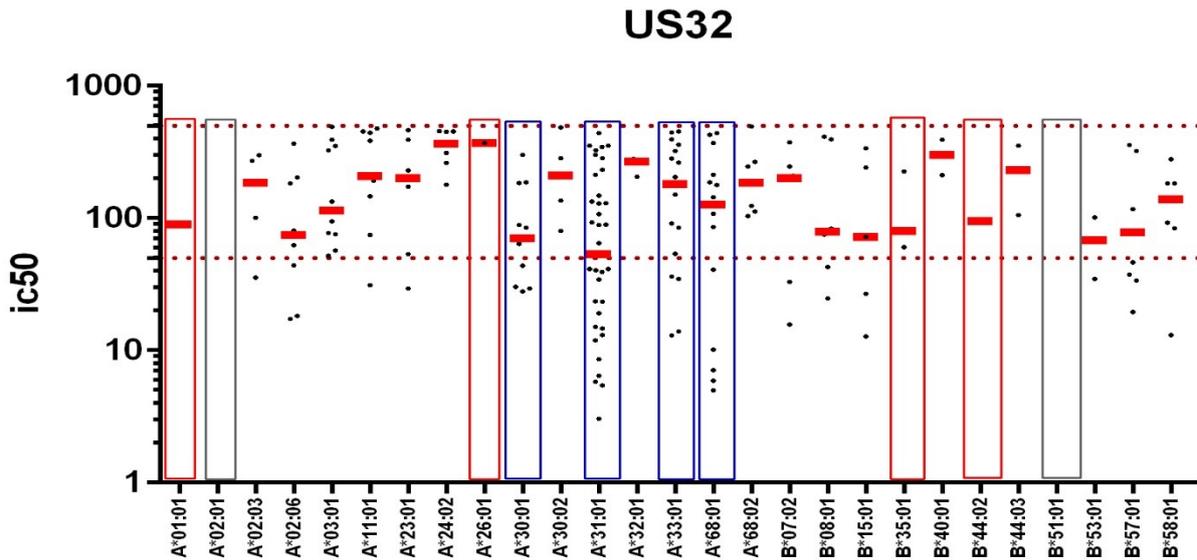


Gráfico. 19 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína US32. Os retângulos azuis representam os HLAs que mais interagem com a proteína e as vermelhas representam HLAs que menos interagem com a proteína. Os retângulos em cinza destacam HLAs que não apresentaram interações de alta ou intermediária afinidade. A parte inferior do gráfico, abaixo da primeira linha vermelha (50nM) estão as ligações de alta afinidade, feitas pelo HLA e entre a primeira e a segunda linha (500nM), estão as ligações de afinidade intermediária.

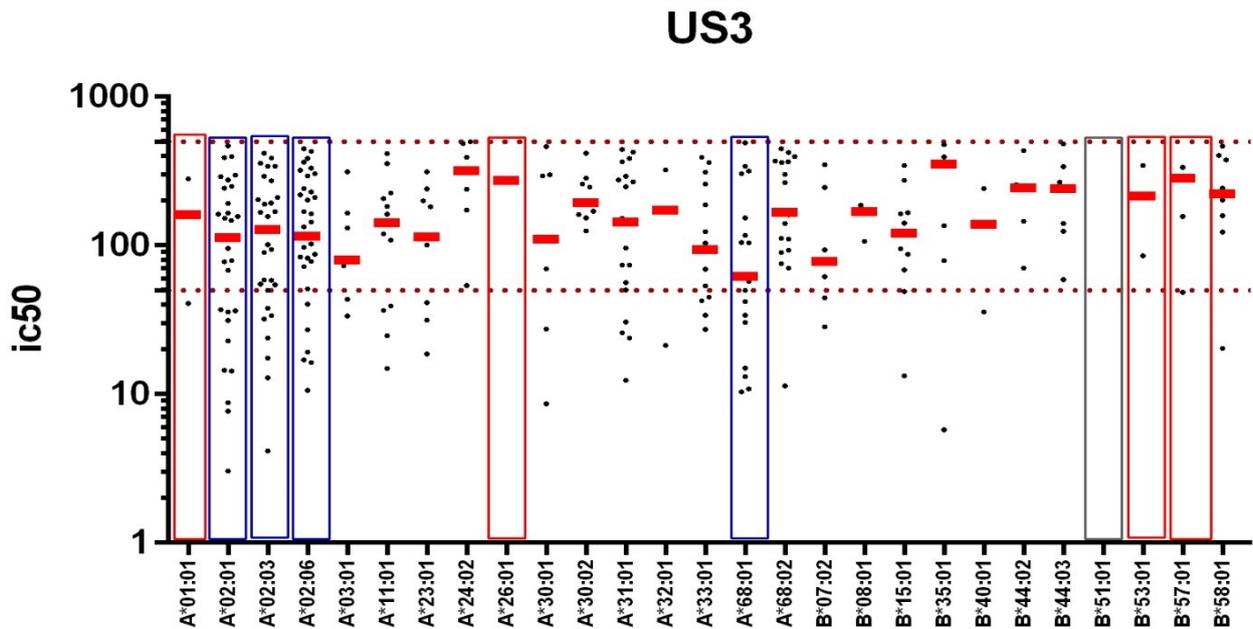


Gráfico. 20 Interação de alta e intermediária afinidade de cada HLA pela estrutura da proteína US3. Os retângulos azuis representam os HLAs que mais interagem com a proteína e as vermelhas representam HLAs que menos interagem com a proteína. A parte inferior do gráfico, abaixo da primeira linha vermelha (50nM) estão as ligações de alta afinidade, feitas pelo HLA e entre a primeira e a segunda linha (500nM), estão as ligações de afinidade intermediária.

As análises presentes no resultado de gráficos de alta e intermediária afinidade (seção 4.3) mostraram que alguns HLAs são ótimos para apresentar epítopos do HCMV, como os HLAs A*02:03, A*02:06, A*31:01 e A*68:01, enquanto outros são fracos em apresentação como A*01:01, A*26:01, B*51:01 e B*44:02. O HLA A*02:03 foi o melhor HLA para responder contra os peptídeos do HCMV, demonstrando altos níveis de interação com todas as proteínas, menos a US32. Em contrapartida, os HLAs A*01:01 e B*51:01 foram os que apresentaram baixa ou nenhuma interação com as proteínas, eles são os principais encontrados nos retângulos em cinza, dos gráficos de alta e intermediária afinidade das proteínas pp65, UL28, UL29, UL122, US3 e US32.

A tabela 4 permite melhor visualização desses “padrões” entre os HLAs que são bons e maus respondedores, mesmo em proteínas distintas, observa-se a predominância dos mesmos HLAs, reforçando a possibilidade de considerá-los como bons ou maus respondedores.

Tabela 4. HLAs predominantes em interações fracas e fortes de acordo com a proteína

PROTEÍNA	HLA DE MAIORES INTERAÇÕES	HLA DE MENORES INTERAÇÕES	HLA SEM INTERAÇÃO
PP65	A*02:03>A*02:06>A*68:01>A*68:02	B*44:02>A*26:01/A*32:01>B*57:01	A*01:01 B*51:01
UL48	A*02:03>A*02:06>A*31:01>A*68:01	B*44:02>A*26:01>A*01:01>B*51:01	XXX
UL28	A*02:03>A*02:06>A*31:01>A*68:01	B*44:02>B*53:01>A*01:01>A*26:01	B*51:01
UL29	A*02:06>A*02:03>A*31:01>A*68:02	B*58:01>B*53:01>A*01:01>A*26:01	B*51:01
UL32	B*07:02>A*68:02>A*02:03>A*68:01	A*24:02>A*26:01>A*01:01>B*51:01	XXX
UL55	A*02:03>A*02:06>A*68:01>A*68:02	B*44:03>B*08:01>B*53:01>B*51:01	XXX
UL122	A*02:03>A*02:06>A*68:02>B*07:02	A*23:01/A*26:01/B*51:01>B*44:03	A*01:01
UL123	A*02:03>A*02:06>A*68:01>A*68:02	B*51:01/B*57:01/B*58:01/A*26:01	XXX
US3	A*02:01>A*02:03>A*02:06>A*68:01	B*57:01/A*01:01/B*53:01>A*26:01	B*51:01
US32	A*31:01>A*33:01>A*68:01>A*30:01	B*35:01>A*26:01>B*44:02/A*01:01	A*02:01 B*51:01

5. DISCUSSÃO

Considerando a infecção por HCMV, a sua alta frequência e fácil transmissão faz com que seja um vírus amplamente disseminado na população. Em indivíduos imunocompetentes, sabe-se que os impactos não são tão alarmantes quando comparado a infecção em imunossuprimidos. Sua grande capacidade de mutação e dificuldade de tratamento em casos graves faz com que o manejo clínico com pacientes de risco, como os transplantados, necessite de cuidados que vão além do diagnóstico.

Os métodos de diagnóstico do vírus existentes na atualidade mostram-se eficazes para detecção, mas detectar a presença do HCMV não elucida as dúvidas de qual direcionamento clínico será o mais adequado para o paciente, visto que o quadro clínico do transplantado pode variar. E por isso, ferramentas com alta confiabilidade, que possam auxiliar nesse direcionamento clínico mais exato podem reduzir a chance de erro e aumentar a confiança dos médicos na conduta clínica.

Pode-se dividir em duas partes a importância do HLA I: o processamento e apresentação do antígeno viral. Todas as células nucleadas do organismo apresentam antígenos intracelulares através do HLA I, incluindo os peptídeos virais. E por se tratar de uma apresentação via HLA I, o complexo formado entre o HLA I e o peptídeo precisa ser reconhecido pelo receptor do linfócito (TCR), e a interação estabelecida entre o peptídeo apresentado e o TCR precisa ser boa o suficiente para desencadear o mecanismo seguinte de sinalização imunológica, determinante no curso da resposta.

Embora tenha uma relativa abundância de HLA I expressos nas células, os vírus, assim como o HCMV, dispõem de mecanismos de evasão imunológica, que ao penetrar na célula do indivíduo, consegue anular a expressão do HLA I, dificultando sua apresentação para o sistema imune e facilitando sua sobrevivência. O sistema imune possui recursos para identificar esse mecanismo ativo, como por exemplo a função das células NK. Porém, em pacientes imunossuprimidos o conjunto de ações imunológicas está comprometido, o que contribui muito para a replicação do vírus e desenvolvimento de uma infecção mais grave.

Os indivíduos que possuem os HLAs caracterizados como “maus apresentadores”, podem ser considerados mais propensos à infecção por HCMV, por não conseguir apresentá-lo de forma adequada ao sistema imunológico? Indivíduos que possuem HLAs de alta afinidade pelas proteínas formadas seriam os indivíduos mais capazes de combater o vírus? As respostas a estas perguntas podem apresentar grande impacto no contexto clínico, uma vez que poderia significar um olhar mais cauteloso para o comportamento de indivíduos que são sabidamente maus respondedores a proteínas do HCMV. Infelizmente a literatura não nos permite definir com clareza estas respostas, seja no contexto clínico *in vivo* ou em estudos de experimentos *in vitro*.

Resultados obtidos no estudo de mutações pós-transmissão de HIV-1, associados a fuga da resposta imune citotóxica, realizado pelos autores G. Damilano, O. Sued, et al. (2019), sugerem que exista uma adaptação do HIV-1 aos alelos HLA A/B prevalentes na população. Apesar disso, não é totalmente clara a relação entre a frequência de escape desenvolvida pelo vírus e as moléculas de HLA. Sugere-se no artigo o estudo de regiões do genoma viral com redução na capacidade de evasão do vírus, isso poderia ser alvo de desenvolvimento de uma vacina eficaz, favorecendo a escolha para sequencias mais estáveis ao longo do tempo (35).

O estudo conduzido por Varun Chauha et al., realizou o desenho de um multiepítipo vacinal contendo epítipos do HCMV que poderiam ativar linfócitos T, B e células produtoras de IFN com o intuito de proporcionar uma imunidade efetiva para o hospedeiro. O artigo cita estudos com outros tipos de doenças como HIV, dengue, Zika e hepatite C, que utilizam imunoterapias baseadas em imunoinformática para seleção de peptídeos são realizados na atualidade por diversos grupos de pesquisa (36).

Um estudo realizado na Irlanda em 2016 (42), determinou a soroprevalência de HCMV em doadores de órgãos (1990-2013) e a associação de alelos do MHC I com a frequência de infecção por HCMV no país. As frequências de HLA-A1, HLA-A2 e HLA-A3 foram de 40,8%, 48,8% e 25,9%, respectivamente e os HLAs B5, HLA-B7 e HLA-B8 foram 6,1%, 31,2% e 30,8%. De acordo com os autores, a soroprevalência de HCMV na Irlanda é menor em relação à outros países, e associam isso com a alta

frequência dos haplótipos de HLA que não possuíam IgG positivo (HLA-A1 e B8), inferindo que isso facilite a redução da susceptibilidade à infecção por HCMV no país.

Atualmente a ciência lida com grande quantidade de informações vindas de banco de dados, genomas e literatura sobre os mais diversos temas. A bioinformática e a imunoinformática é mais uma forma de agregar conhecimento para experimentos e pesquisas, somando a imunologia experimental com ciência computacional. A identificação de potenciais marcadores imunogênicos para linfócitos T e B em uma sequência de proteínas por exemplo, pode auxiliar uma pré-seleção do que realmente é relevante para um estudo de produção de vacinas.

Mesmo sendo um formato de estudo de difícil validação, proporciona a visualização de caminhos passíveis de testes ao planejar um experimento, ou elaborar uma hipótese. Por isso, as predições realizadas necessitam passar pelo desenvolvimento de um algoritmo funcional, de modo que seja possível transforma-los em números absolutos. Concomitante a isso, faz-se necessário o estudo de perfil imunológico do transplantados com os respectivos HLAs para observar o desfecho clínico, e comparar com as predições realizadas *in silico*.

Além da apresentação de antígenos pelo HLA, outros processos são determinantes para uma boa resposta imunológica e ativação de linfócitos, como a atuação de moléculas co-estimulatórias, citocinas e recrutamento celular, portanto, não podemos restringir apenas à atuação do HLA com o TCR. Dessa forma, considerar o HLA não apenas para compatibilidade em transplante de órgão, mas como auxílio no manejo clínico ou tratamento de infecções virais, poderá ser mais um critério avaliado no cuidado com determinado paciente que expressa HLAs que são maus apresentadores por exemplo.

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitiram a determinação do grau de afinidade de ligação dos diferentes tipos de HLA aos epítomos das principais proteínas antigênicas do HCMV. Este inédito conhecimento *in silico*, uma vez confirmado *in vitro* e *in vivo*, possivelmente será capaz de proporcionar o desenvolvimento de métodos diagnósticos e terapêuticos inovadores, que terão como base a particularidade genética e imunológica de cada indivíduo.

7. REFERÊNCIAS

1. Adams, A.B; Williams, M.A; Jones, T.R, et al. (2003) **Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance**. The Journal of Clinical Investigation. 111: 1887–1895
2. Chinen, J; Buckley, R.H. (2010) **Transplantation immunology: solid organ and bone marrow**. The Journal of Allergy and Clinical Immunology. 125(2 Suppl 2):S324-35
3. Compton, T; Nowlin, D.M; Cooper, N.R. (1993) **Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate**. Virology 193: 834–841.
4. Courtney, A.H; Lo, W.L, Weiss, A. (2017) **TCR signaling: mechanisms of initiation and propagation**. Trends in Biochemical Science. 43:108–23.
5. DeMeritt, I.B; Milford, L.E; Yurochko, A.D. (2004) **Activation of the NF-kappaB pathway in human cytomegalovirus-infected cells is necessary for efficient transactivation of the major immediateearly promoter**. Journal of Virology, 78:4498–507.
6. Foley, B; Cooley, S; et al. (2012) **Human cytomegalovirus (CMV)-induced memory-like NK cells are transplantable and expand in vivo in response to recipient CMV antigen**. Journal of Immunology, 189: 5082–5088.
7. Fonseca, M.A.; Carvalho, A.M. (2005). **Fragmento de vida: Representações sociais de doação de órgãos para transplante**. Interações, v. 10, n. 20, São Paulo, p. 85-108, julho-dezembro.
8. Granato, C. (2001) **A problemática da infecção pelo citomegalovírus em pacientes imunodeprimidos**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São José do Rio Preto, v. 23, n. 3, p. 130-132.
9. Halary, F; Amara, A; Lortat-Jac, H. et al.(2002) **Human cytomegalo-virus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection**. Immunity - 17: 653–664.
10. Harjula, A; Hockerstedt, K. (1995) **Preface. Atlas of Clinical Transplantation**. In: Ari Harjula, Krister Hockerstedt. Recallmed Ltd., pág. 09.
11. Hummel, M; Abecassis, M.M. (2002) **A model for reactivation of CMV from latency**. Journal of Clinical Virology, 25(Suppl 2): S123–S136
12. Joffre, M.R. (2011) **Imunodepressão, Imunossupressão**. Revista de Patologia Tropical. Vol. 40 (2): 199-201. abr.-jun. 2011.
13. Junqueira, J.J; SANCHO, T.M. (2008) **Citomegalovírus: Revisão dos Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Diagnósticos e de Tratamento**. News Lab. São Paulo, ed 86, p. 88-104.

14. Kaminski, H; Fishman, J.A. (2016) **The cell biology of cytomegalovirus: implications for transplantation.** American Journal of Transplantation, 16(8):2254–2269
15. Kato, M; Morozumi, K; et al. (2003) **Complement fragment C4d deposition in peritubular capillaries in acute humoral rejection after ABO blood group-incompatible human kidney transplantation.** Transplantation - 75:663.
16. Li, X.C; Rothstein, D.M; Sayegh, M.H. (2009). **Costimulatory pathways in transplantation: challenges and new developments.** Immunological Reviews, 229: 271-293
17. Lundegaard, C; Nielsen, M; Lund, O. (2006) **The validity of predicted T-cell epitopes.** Trends Biotechnology 24:537–8.
18. Macedo, C. et al. (2009) **Contribution of naive and memory T-cell populations to the human alloimmune response.** American Journal of Transplantation. 9:2057–66.
19. Miller-Kit, M; Sparer, T.E. (2009) **Feeling manipulated: Cytomegalovirus immune manipulation.** Virology Journal, 6: 4.
20. Mills, K.H. (2011) **TLR-dependent T cell activation in autoimmunity.** Nature Reviews in Immunology. 11:807–22.
21. Nielsen, M. et al. (2004) **Improved prediction of MHC class I and class II epitopes using a novel Gibbs sampling approach.** Bioinformatics, 20, 1388–1397
22. Numar, H; Kawai, T; Akira, S. (2011) **Pathogen recognition by the innate immune system.** International Reviews of Immunology. 30: 16–34.
23. Pereira, W.A. (2004). **Manual de Transplantes de Órgãos e Tecidos.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
24. Poole, E; McGregor, S.R; et al. (2011) **Virally induced changes in cellular microRNAs maintain latency of human cytomegalovirus in CD34 progenitors.** Journal Genetics and Virology, 92:1539–49.
25. Rathinam, V.A; Jiang, Z; et al. (2010) **The AIM2 inflam-masome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses.** Nature Immunology 11: 395–402.
26. Salmela, K; Ahone, J; Helsinki; Kootstra, G; Maastricht. (1995). **Renal Transplantation. Atlas of Clinical Transplantation.** Recallmed Ltd., pág. 69.
27. Schafer, D.F. (2001). **Liver Transplantation. Looking Back, Looking Forward.** Transplantation of the Liver. Maddrey WC, Schiff ER, Sorrell MF, editors.

28. Soderberg, C; Giugni, T.D; Zaia, J.A. et al. (1993) **CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection.** Journal of Virology, 67: 6576–6585.
29. Soderberg-Naucler, C; Fish, K.N; Nelson, J.A. (1997) **Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines.** Journal of Clinical Investigation, 100: 3154–3163.
30. Süsal, C; Opelz, G. (2013). **Current role of human leukocyte antigen matching in kidney transplantation.** Current Opinion in Organ Transplantation, 18(4):438-444.
31. Van Stijn, A. et al. (2008). **Human cytomegalovirus infection induces a rapid and sustained change in the expression of NK cell receptors on CD8+ T cells.** Journal of Immunology, 180, 4550–4560.
32. Woodroffe, S.B; Garnett, H.M; Danis, V.A. (1993) **Interleukin-1 production and cell-activation response to cytomegalovirus infection of vascular endothelial cells.** Archives of Virology, 133: 295–308.
33. Ramanan, P; Razonable. (2013) **Cytomegalovirus Infections in solid organ transplantation: A review.** Infection and Chemotherapy Journal. Minnesota, EUA.
34. Razonable, R; et al. (2001) **Alograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir.** J Infect Dis. 184:1461-4.
35. G. Damilano, O. Sued, S. Satorres, et al. (2020) **Bioinformatic analysis of post-transmission viral readaptation in Argentine patients with acute HIV-1 infection.** Infection, Genetics and Evolution.
36. Varun Chauhan , Mini P Singh (2020). **Immuno-informatics approach to design a multi-epitope vaccine to combat Cytomegalovirus infection.** European Journal of Pharmaceutical Sciences.
37. Quinzo, M.J., Lafuente, E.M., Zuluaga, P. et al. (2019) **Computational assembly of a human Cytomegalovirus vaccine upon experimental epitope legacy.** BMC Bioinformatics 20, 476.
38. **Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex.** Nature 401, 921–923 (1999).
39. Dausset, J. (1984), **The Birth of MAC.** Vox Sanguinis, 46: 235-237
40. Goldberg, Anna Carla; RIZZO, Luiz Vicente (2015). **Estrutura do MHC e função – apresentação de antígenos. Parte 1.** Einstein (São Paulo), São Paulo, v. 13, n. 1, p. 153-156.

- 41.V. Renganathan (2019). **Overview of artificial neural network models in the biomedical domain**. Bratislava Medical Journal Vol.120, No.7, p.536–540.
- 42.Hassan, Jaythoon & O'Neill, Derek et. al. (2016). **Cytomegalovirus Infection in Ireland**. Medicine. 95. e2735.

8. Anexos

Tabela 5. Sequência peptídica das 10 proteínas do HCMV

PROTEÍNA	TAMANHO	SEQUÊNCIA
UL48	2241	MKVTQASCHQGDIAIRFGARAGNQVCVNGIMFLHALHLGGTSAVLQTEALDAIMEEGARLDARLEREL QKKLPAGGRPLVYRGLGDEVPRRLESRFGRVHALSRPFNGTETCDLDGVMCPGIFDFLRYAHAKPR PTYVLTVNSLARAVFTEDHMLVDFPHSSAECHNAAYHCEGLHQVLMVLTGFGVQLSPAFYFYEALF LYMLDVATVPEAEIARLVSTYRDRDIDLTVVRESADTAATTTAAPSPLPDPPIVDPGCPGVA PSI PVYDPPSSPKKTPKRRKDLSGSKHGGKKPPSTTSKTLATASSSPSAIAAASSSSAVPPSYSCGEGA LPALGRYQQLVDEVEQELKALTLPLPANTSAWTLHAAGTESGANAATATAPSFDEAFLTDRLQQLIHH AVNQRSCLRRPCGPQSAQAQAVRAYLGLSKKLD AFLNNWLHHLGLDQRMHDYLSHKTKTGYSTLD RALLEKMQVDFDPYGRQHGPAIAWVEMLRYVESKPTNELSQRQRVTKRMPVSDSFVCLRPVD FQRLTQVIEQRRRVLQRQREYHGVYEHLAGLITSIDIHDLASDLNRREILKALQPLDDNAKQELFRLG NAKMLELQMDLDRSTQLLTRVHNHILNGFLPVEDLKQMERVVEQVLRIFYDLRDLKCDGSEYEEGFV VIREQSYLMTGTVRDNVPLLQEIQLRHAYQQATQQNEGRITQIHDLLHVIETLVRDPGSRGSALT LVQEQLAQLEALGGLQLEPQQRLQNAQLALSRLYEEEEETQRFLDGLSYDDPTEQTIKRHPQLREM LRRDEQTRLRLINAVLSMFHTLVMLARDESPPRPTFFDAVSLLLQQLPPDSHEREDLRAANATYAQM KKLEQIEKAGTGASEKRFQALRELVYFRNHEFFQHMMVGRGLGVGPQVTELYERYQHMEEQHLERL EREWQEEAGKLTVTVEDVQVRLARAPSHRVMHQMQQTLLTKMQDFLDKEKRRQEEQQRQLLDGY QKKVQDLQRVVDVAVKGEMLSTIPHQPLEATLELLGLDQRAQPLLDKFNQDLLSALQQLSKLDGRI NECLHGVLTGDVERRCHPHREAAQTQASLNHLQILGPQLLIHETQQALQHAVHQAFIEKQQQGD PTTAITGSEFESDFARYRSSQKMEGQLQETRQMTETSERLDRSLRQDPGSSSVTRVPEKPFKQG ELAGRITPPPADFRQPVFKLLDQQAADAARKALSDEADLLNQKVTQLRQRDEQLSTAQNLTDLVT RHKMSGGLDVTTPDAKALMEKPLETLRELLGKATQQLPYLSAERTVRWMLAFLEEAQAQITADPTPH HGSRTHYRNLQQQAVESAVTLAHQIEQNAACENFIAHQHEATANGASTPRVDMVQAVEAVWQRLEP GRVAGGAARHQKQVQELLQRLGQTLGDLLELQETLATEYFALLHGIQTFYSYGLDFRSQLEKIRDLRFA ELAKRCGTRLSNEGALPNRKPQATTSLGAFTRGLNALERHVQLGHQYLLNKLNGSSLVYRLEDIPSV LPPTHETDPALIMRDLRRLRCFARHHDTFLEVVDVFGMRQIVTQAGEPIYLVTDYGNVAFKYLALRDDG RPLAWRRRCSSGGGLKVVVTTRYKAITVAVAVQCQLRTRFWPQISQYDLRPLYLQHQSHTHPAETHLH NLKLCYLVSTAWHQRIDTQQLTAADRVGSGEGGDVGEQRPGRGTVLRLSLQEFVLIALPEYIY TVLKYVQMSLPSLTAHLHQDVIIHAVVNNTHKMPDHLPEQVKAFCITPTQWPAMQLNKLFWENKLV QQLCQVGPQKSTPSLGLWLAMATLVFPQDMLQCLWLELKPQYAEYASVSELVQTLFQIFQCE MVTGYTQPQLPTGEPVLQIRVRRQDTTTTDTNTTTEPGLLDVFIQETALDYALGSLWFLGIPCLGV HVADLLKQGRVVARHLEYTSRDRDFLRIRSRDLNLSQLLQDWTWETPLEHCWLQAQIRRLRDLRFR PTRLEFIPLVIYNAQDHTVVRVLRPPSTFEQDHSRLVDEAFPTFPLYDQDNTSADNVAASGAAPT VFPNRVVPVNIQFLRENPPPIARVQPPRRHRHRAAAAADDDGQIDHQDQDTSRTADSLVSTAFGGS VFQENRLGETPLCRDELVAVAPGAASTSFASPPITVLTQNVLSALEILRVLRLDLRQLAQSVDTIQHM RFLYLL
pp65/UL83	561	MESRRRCPEMISVLGPISGHVLKAVFSRGDTPVLPHETRLQTGIHVRVVSQPSLILVSQYTPDSTPCH RGDNQLQVQHTYFTGSEVENSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPLKMLNIPSNVHHYPSAAER KHRHLPVADAVIHASGKQMWQARLTVSGLAWTRQQNQWKEPDVYYSAFVFPKDVVALRHVVCAGE LVCSMENTRATKMQVIGDQYVVKVYLESFCEDVPSGKLFMHVTLGSDVEEDLMTNRNPQPFMRPHER NGFTVLCPKNMIIKPGKISHIMLDVAFTSHEHFGLLCPKSIPGLSINLLMNGQQIFLEVQAIRETVL QYDPVAALFFDIDLLQRPQYSEHPTFTSQYRIQGKLEYRHTWDRHDEGAAQGGDDVWTSFGSDS DEELVTTERTKTPRVTGGGAMASASTSAGRKRKSASSATACTAGVMTRGRLLKAESTVAPEEDTDESD NEIHNPAVFTWPPWQAGILARNLVPVATVQGGQNLKYQEFFWDANDIYRIFAELEGVWQPAAPKRR RHRQDALPGPCIASTPKKHRG
UL122/IE2	580	MESSAKRKMDPNDPDEGPSSKVPREPVTKATFLQTMRLKEVNSQLSLGDLPELAEESLKTFE QVTEDCNENPEKDVLTGDLAQAVNHAGIDSSSTGPTLTHSCSVSSAPLNKPTPTSVAVTNTPLPG ASATPELSPRKKPRKTRPFKVIKPPVPPAPIMLPLIKQEDIKPEPDFTIQYRNKIIDTAGCIVISDSEEEQ GEEVETRGATASSPSTGSGTPRVTSPTHPLSQMNHPLPDPLGRPDEDSSSSSSSSSSSSASDSESES EEMKCSSGGGASVTSHHGRGGFGGAASSLLSCGHQSSGGASTGPRKKKSKRISELNDEKVRNIM KDKNTPFCTPNVQTRRGRVVIDEVSFRHTNRSLEYKNLPPMIPSMHQVLEEAIVCKTMQVNNKGI QIYYTRNHEVKNEVDQVRCRLGSMCNLALSTPFLMEHTMPVTHPPDVAQRTADACNDGVKAVWNLKE LHTHQLCPRSSDYRNMIHAATPVDLLGALNLCLPLMQKFKQVMVRFSTNQGGFMLPIYETAAKAYA VGQFEKPTETPPEDLDTLSLAIEAAIQDLRNKQS
UL123/IE1	397	MMGYGAISSLTEFCRVLCYILEETSULLAKRPLITKPEVINIMKRRIEIECMKVFAQYILGADPLRVCS SVDDLRAIAEESDEENAIAYTLATAGASSSDSLVSPPEPVPATIPLSSVIVAENSQDEESEQSDERE EGAQEEREDTVSVKSEPVSEIEQVASEEEEEEDGAEPTTSGGKSTHPMVRTRSKADH
US32	183	MAMYTSERDWRRIHDSHGLWCDCGDWREHLYCVYDSSHFORRPTTRAERRAANWRRQMRRLH RLWFCQDQWKACHALYAEWDGKESDDESSASSSAGEAPEQQVPAWKTVRAFSTRAYHHRINRGLRGT PPRNLPGYEHASEGWRFRCNRRERREDDLRLTRAEPDRVVFQLGGVPPRRHRETVV
UL28	272	MLGDTQYFGVVRDHKTYRRFSCLRQAGRLYFGLVSVYECVPDANTAPEIWWSGHGHAFAFAYLPAGEDK VYVGLSFGGEFFENGLFAVYFFERDYVDEIVEGAWFKHTFAGMYELSQILHRTNLLRVCQLHGSKI RLGGSPACTFTFGSWNVAEADANNFVIGVLEQAHFVVIWMEPVNKA/FMDAHGIIHVLVYGTMLV KLAETLRGFIRQGSFWRFCPRRFCSPLDSSATVAAKPVSSHTSPAYDVSEYVFSGRSVLDSVSGTGA S

US29	462	MRCFRWWLYSGWWLTFGCARTVTVGFVAPTVAQSTVVRSEPPAPPSETRDNDTSYFSSTSFH SSVSPATSVDRQFRRTTYDRWDGRRWLTRYGNASACVTGTQWSTNFFFSQCEHYPSFVKNLGVQ RWTPVRRPMGEVAYYGCCMVGGGNRAYVILVSGYGTASYGNALRVDFGRGNCTAPKRTYPRRLE LHDGRTDPSRCDPYQYFYGLQCPEQLVITAHGGVGMRRCPGSRPTPSRPHRHDLLENELHGLCVD LLVCVLLALLLLELVPMEAVRHPLLFWRVALSPSTSKVDRAVKLCLRRMLGLPPPPSVAPPGEKKEL PAQAALSPLTTWSLPPFPSTRIPDPPPPYQLRHATSLVTVPTLLLYTSSDIGDTASETTCVAHATYGE PPEPARSTATVQECTVLAPNCGIVNNDGAVSEGGQDHGDAVHSLDVSQCAADTGVVDTSE
US3	95	PWFQIEDNRCYIDNGKLFARGSIGVGNMSRFVDPKADYGGVGENLYVHADDVEFVPGESLKWVNRNL DVMPIFETLALRLVLQGDVWLRCPPEL
UL32	1048	MSLQFIGLQRRDVALVNLFRHLTQKPDVDLEAHPKILKCCGEKRLHRRTVLFNELMLWLGYRELF HNPDLSSVLEEFVRCVAVARRGYTYPFGDRGKARDHLAVLDRTEFDTVRHDAEIVERALVSAVILA KMSVRETLVTAIGQTEPIAFVHLKDTEVQRIEENLEGVRRNMFCVKPLDLNDRHANTALVNAVNLVY TGRIMNVRRSWEELERKCLARIQERCKLLVKELRMCLSFDSNYCRNLIKHAVENGDSADTLELLIED FDIYVDSFPQSAHTFLGARSPLEFDDANLLSLGGGSFSSVPPKHHVPTQPLDVGWVIAWSPWKGHK PFRFEAHGSLAPAAEAHAARSAAVGYDEEEKRRERQKRVDDEVVQREKQQLKAWEEERQNLQQR QQQPPPPARKPSASRRLFGSSADEDDDDDEKNIFTPIKKPGTSGKGAASGGGVSSIFSGLLSSGS QKPTSGPLNIPQQQRHAAFSLVSPQVTKASPGRRVRRDSAWDVRPLTETRGDLFSGDESDSSDGY PPNRQDPRFTDLVDITDTESTAKPPVTTAYKFEQPTLTFGAGVNVNVPAGAGAAITPTPVNPSTAPAPA PTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPLPGDMNPANWPRERAWALKNPHLAYNPFMRPTTSTASQNTVST TPRRPSTPRAAVTQTASRDAAEVWALRDQTAESPVEDSEEDDDSDTGSVSLGHTTTPSSDYNN DVISPPSQTPEQSTPSRIRKAKLSSPMTTSTSQKVLGKRVATPHASARAQTVTSTPVQGRLEKQVS GTPSTVPATLLQPQPASSKTTSSRNVTSGAGTSSASSARQPSASASVLSPTEDDVVSPATSPLSMLSS ASPSPAKSAPPSPVKGGRSRVGVPSLKPTLGGKAVVGRPPSVVSGSAPGRLSGSSRAASTTPTTYPA VTTVYPPSSTAKSSVSNAPPVAPSPILKPGASAAALQSRRTGTAAVGSVPKSTTGKMTVAFDLSSPQK SGTGPQPGSAGMGGAKTPSDAVQNLQKIEKINTEE
UL55	907	MESRIWCLVVCVNLIVCLGAAVSSSSTRGTSATHSHSSHTTSAHSRSGSVSQRVTSSQTVSHGV NETIYNTLLKYGDVGVNNTTKYPRVCSMAQGTDLIRFERNIVCTSMPKINEDLDEGIMVYKRNIVAHT FKVRVYQKVLTFRRSYAIHTTYLLGSNTEYVAPPMMWEIHHINSHSQCYSSYSRVIAGTVFVAYHRDSY ENKTMQLMPDDYSNTHSTRYVTVKDQWHSRGSTWLYRETCNLNLCMVTTITARSKYPHYFFATSTGD VVDISPFYNGTNRNASYFGENADKFFIFPNYITIVSDFGRPNSALETHRLVAFLEADSVISWDIQDEKNV TCQLTFWEASERTIRSEAEDSYHFSSAKMTATFLSKKQEVNMSDSALDCVRDEAINKLQIFNTSYNQ TYEKYGNVSVFETTGGLVVFVWQGIKQKSLVELERLANRSSLNLTHNRTKRSTDGNNATHLSNMESVH NLVYAQLQFTYDTRLGYINRALAQIAEAWCVDQRRRTLEVFKELSKINPSAILSAIYNKPIAARFMGDVLG LASCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVIFNFANSSYVQYQQLGEDNEILLGNHRTTEECQLPS LKIFIAGNSAYEYDYLFKRMIDLSSISTVDSMIALDIDPLENTDFRLELYSQKELRSSNVFDLEEIMREF NSYKQRVKYVEDKVVDPPLPYLKGDLMLSGLGAAGKAVGVAIGAVGGAVASVVEGVATFLKNPFGA FTIILVAIAVVIITYLIYTRQRRRLCTQPLQNLFPYLVSADGTTVTSGSKDTSLQAPPSYEEESVYNSGRKG PGPPSSDASTAAPPYTNEQAYQMLLALARLDAEQRAQQNGTDSLDRGTGTQDKGQKPNLLDRLHR KNGYRHLKDSDEEENV