



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO *IN SILICO* PARA A UTILIZAÇÃO DO HTLV-2 ATENUADO  
COMO VETOR VACINAL CONTRA A INFECÇÃO PELO HTLV-1**

**FERNANDA KHOURI BARRETO**

**Salvador – Brasil  
2013**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa**

**ESTUDO *IN SILICO* PARA A UTILIZAÇÃO DO HTLV-2 ATENUADO  
COMO VETOR VACINAL CONTRA A INFECÇÃO PELO HTLV-1**

**FERNANDA KHOURI BARRETO**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Aline Cristina Andrade Mota Miranda

Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa para a  
obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Brasil**  
**2013**

## **Folha de Aprovação**

**(Será oferecida pela Coordenação de Ensino)**

**FONTES DE FINANCIAMENTO**

FAPESB

FIOCRUZ

BARRETO, Fernanda Khouri. Estudo *in silico* para a utilização do HTLV-2 atenuado como vetor vacinal contra a infecção pelo HTLV-1. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

## RESUMO

O HTLV-1 foi o primeiro retrovírus descrito associado a doenças humanas, tais como leucemia de célula T do adulto (ATLL), paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV (TSP/HAM), dermatite infecciosa, entre outras. Esse retrovírus possui um genoma de RNA de fita simples, com os genes *gag* (grupo antigênico), *env* (envelope), *pol* (polimerase), e uma região próxima à extremidade 3' conhecida como *pX*. Em cada extremidade do genoma existem sequências de repetições terminais longas (LTR – long terminal repeat), que são essenciais na integração do DNA proviral ao DNA do hospedeiro, e também para a regulação transcricional do genoma do vírus. Estima-se que cerca de 5-10 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 no mundo. No Brasil, presume-se que 2,5 milhões de pessoas estejam infectadas. Apesar da infecção pelo HTLV-1 ser endêmica em diferentes regiões geográficas do mundo, ainda permanece sem um método de profilaxia eficaz. Pesquisas realizadas em macacos-esquilos no Instituto Pasteur da França e no Instituto Nacional do Câncer nos EUA avaliaram a imunogenicidade e a eficácia de uma vacina contendo o gene *env* ou *env* e *gag* do HTLV-1. Após a vacinação e transfusão de células infectadas com o HTLV-1 todos os animais mostraram-se protegidos. Anteriormente a este estudo, pesquisadores do Instituto Nacional do Câncer, NIH-EUA, avaliaram a eficácia de um vetor vacinal derivado do vírus da varíola atenuado contendo o gene *env* do HTLV-1 (R-ALVAC), e após o desafio vacinal todos os animais mostraram-se protegidos. Porém, a proteção destes dois estudos não foi permanente. Entretanto, esses resultados sugerem que uma vacina anti-HTLV-1 pode ser viável e, acreditamos que a produção dessa vacina tendo como vetor um vírus persistente como o HTLV-2 pode proteger contra a infecção pelo HTLV-1. Assim, desenvolvemos em colaboração com o NIH, um vetor vacinal contendo as duas regiões LTR do HTLV-2, para serem inseridos os genes *gag* e *env* do HTLV-1 sob o controle da região 3'LTR deste vetor. Para a utilização desse vetor recombinante faz-se necessário caracterizar a região promotora do HTLV-2, avaliando assinaturas nucleotídicas presentes em diferentes subtipos, bem como a presença de *motifs* importantes para a expressão do vetor vacinal. Pelo exposto, o objetivo principal desse trabalho foi avaliar *in silico* a habilidade do vetor recombinante do HTLV-2 poder ser utilizado como vetor vacinal anti-HTLV-1. Nossos resultados revelaram que existem pequenas diferenças na região promotora dos subtipos HTLV-2a, HTLV-2b, HTLV-2c e HTLV-2d. Algumas alterações resultam em ganho ou perda de *motifs* importante para a regulação da transcrição gênica, como o *motif* E Box, presente nas sequências dos diferentes subtipos do HTLV-2 e ausente na região promotora do vetor. Entretanto, estudos sugerem que esse *motif* pode ser responsável pela repressão da transcrição gênica e, portanto, essa diferença encontrada entre o vetor recombinante do HTLV-2 e as diferentes sequências analisadas sugere que a transcrição gênica do vetor vacinal sem esse *motif* pode ser mais eficiente. Logo, o vetor recombinante do HTLV-2 pode ser utilizado como vetor vacinal anti-HTLV-1 em ensaios pré-clínicos.

Palavras-chave: HTLV-1, HTLV-2, LTR.

BARRETO, Fernanda Khouri. Study in silico for use of HTLV-2 attenuated as vaccinal vector against HTLV-1 infection. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2013.

### ABSTRACT

The HTLV-1 was first described retroviruses associated with human diseases, such as leukemia adult T cell (ATLL), tropical spastic paraparesis / HTLV-associated myelopathy (TSP / HAM), infective dermatitis, among others. This retrovirus has a genome of single-stranded RNA, with the genes gag (group antigen), env (envelope), pol (polymerase), and a region near the 3' end known as pX. At each end of the genome are sequences of long terminal repeat (LTR) that are essential for the integration of the proviral DNA in the host DNA and also for the transcriptional regulation of the virus genome. It is estimated that about 5-10 million people are infected with HTLV-1 worldwide. In Brazil, it is assumed that 2.5 million people are infected. Despite the HTLV-1 is endemic in different geographic regions of the world still remains without an effective method of prophylaxis. Research conducted in squirrel monkeys at the Pasteur Institute in France and the National Cancer Institute in the USA evaluated the immunogenicity and efficacy of a vaccine containing the env gene or env and gag of HTLV-1. After vaccination and transfusion of infected cells with HTLV-1 all animals were shown to be protected. Prior to this study, researchers from the National Cancer Institute, NIH, USA, evaluated the efficacy of a vector vaccine derived from attenuated smallpox virus containing the env gene of HTLV-1 (R-ALVAC) and after challenge all animals were shown to be protected. However, the protection of these two studies was not permanent. At the same time, these results suggest that a vaccine anti-HTLV-1 may be feasible and we believe that the production of this vaccine as a vector having one persistent virus as HTLV-2 can protect against HTLV-1 infection. Thus, we developed in collaboration with the NIH, a vector vaccine containing the two LTR of HTLV-2, that will be inserted the env and gag genes of HTLV-1. To use this recombinant vector is necessary characterize the promoter region of HTLV-2, evaluating nucleotide signatures present in different subtypes, as well as the presence of motifs important for the expression vector vaccine. For these reasons, the aim of this study was to evaluate in silico the ability of recombinant vector of HTLV-2 be able to be used as a vector vaccine anti-HTLV-1. Our results reveal that there are small differences in the promoter region of HTLV-2a, HTLV-2b, HTLV-2c and HTLV-2d. Some changes results in loss or gain of motifs important for regulation of gene transcription, such as the E box motif present in the sequences of the different subtypes of HTLV-2 and absent in the promoter region of the vector. However, studies suggest that this motif can be responsible for the repression of gene transcription, and therefore this difference found between the recombinant vector of HTLV-2 and different sequences suggested that the analyzed gene transcription vector vaccine without this motif can be more efficient. Therefore, the recombinant vector HTLV-2 can be used in preclinical trials as a vaccine vector for HTLV-1.

Key-words: HTLV-1, HTLV-2, LTR.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição do HTLV-1 no mundo.....	14
Figura 2. Mapa da prevalência de Elisa positivo para HTLV-1 em doadores de sangue no Brasil.....	15
Figura 3. Distribuição dos subtipos do HTLV-1 no mundo.....	16
Figura 4. Distribuição dos subtipos do HTLV-2 no mundo.....	17
Figura 5. Estrutura morfológica do HTLV-1.....	21
Figura 6. Estrutura genômica do HTLV-1 e processamentos de RNA.....	22
Figura 7. Representação esquemática da região pX do genoma do HTLV-1.....	25
Figura 8. Ciclo de replicação clássica dos retrovírus.....	27
Figura 9. Contribuição da gp46 no ciclo de replicação do HTLV-1.....	28
Figura 10. Sinapse Viral.....	29
Figura 11. Disseminação viral através da formação de biofilmes.....	29
Figura 12. Formação de Conduítes.....	30
Figura 13. Ativação da resposta imune adaptiva.....	32
Figura 14. Desenho esquemático do vetor.....	38
Figura 15. Análise Filogenética da região LTR do HTLV-2.....	47
Figura 16. Análise molecular da região promotora do vetor vacinal HTLV-2.....	48
Figura 17. Análise do sequenciamento dos clones gerados após mutagênese sítio dirigida para a mutação F14S.....	51
Figura 18. Gel de agarose 1% corado com Syber Safe, para demonstrar o sucesso da amplificação do gene <i>env</i> .....	52
Figura 19. Eletroferograma ilustrativo do sequenciamento do produto da PCR realizada com os <i>primers</i> gp46F e gp46R.....	53
Figura 20. Gel de agarose 0,6% corado com Syber Safe, para demonstrar o sucesso na digestão do vetor HTLV-2.....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mutações identificadas a partir da caracterização molecular da gp46 .....	49
Tabela 2. Resumo dos <i>primers</i> utilizados para reação de mutagênese sítio dirigida .....	50
Tabela 3. Resumo dos <i>primers</i> utilizados para PCR .....	52



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- APC – Células apresentadoras de antígenos
- ATLL - Leucemia/linfoma de células T do adulto
- BLV - Vírus da leucemia bovina
- BRC - Receptores de células B
- CD4+ - Linfócitos T CD4+
- CD8+ - Linfócitos T CD8+
- CMV - Citomegalovírus
- CTL - Linfócito T citotóxico
- DC - Célula dendrítica
- DNA - Ácido desoxirribonucléico
- E Box – Enhancer
- env – Envelope
- gag - Grupo antigênico
- GLUT-1 - Molécula transportadora de glicose tipo 1
- HBZ - HTLV-1 bZIP factor gene
- HIV-1 - Vírus da imunodeficiência humana
- HLA - Antígeno leucocitário humano
- HSPG - Heparan Sulfato-Proteoglicano
- HTLV - Vírus linfotrópico de células T humanas
- HTLV-1 - Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1
- HTLV-2 - Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 2
- HTLV-3 - Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 3
- HTLV-4 - Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 4
- MHC-I - Complexo de Histocompatibilidade principal classe 1
- MHC-II - Complexo de Histocompatibilidade principal classe 2
- Mo- Cepa referência do genoma do HTLV-2
- NCI-NIH - *National Institutes of Health*
- NK - *Natural Killer*
- NRP-1 - Neurofilina 1
- OMS - Organização Mundial de Saúde
- ORF - Fase de leitura aberta (Open Reading Frame)

p12, p30 e p13 - Proteínas acessórias

p15 - Proteína do nucleocapsídeo

p19 - Proteína da matriz

p24 - Proteína do capsídeo

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pol – Polimerase

PTLV - Vírus linfotrópico de células T de primatas

RNA - Ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub> - Ácido ribonucleico mensageiro

STLV - Vírus linfotrópico de células T em Símios

SU - Proteína de superfície

TCR – Receptores de células T

TM - Proteína transmembrana

TSP/HAM - Paraparesia Espástica Tropical/ Mielopatia Associada ao HTLV

UDI - Usuários de drogas injetáveis

WB - Western Blot

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
1.1	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas (HTLV) .....	13
1.1.1	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do Tipo 1 (HTLV-1).....	13
1.1.2	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do Tipo 2 (HTLV-2).....	16
1.2	Vias de Transmissão.....	17
1.3	Manifestações Clínicas.....	18
1.3.1	Associadas ao HTLV-1 .....	18
1.3.2	Associadas ao HTLV-2 .....	20
1.4	Estrutura do HTLV-1 .....	21
1.5	Organização Genômica do HTLV-1 .....	22
1.5.1	Região Promotora .....	23
1.5.2	Genes Estruturais.....	24
1.5.3	Genes Regulatórios.....	25
1.6	Ciclo de Disseminação do HTLV-1 .....	26
1.7	Resposta Imune na Infecção pelo HTLV-1 .....	30
1.8	Diagnóstico Sorológico e Tratamento .....	32
1.9	Desenvolvimento de Vacinas .....	33
1.9.1	Perspectiva Histórica .....	33
1.9.2	Vacinas Anti-HTLV-1 .....	35
2	JUSTIFICATIVA.....	37
3	OBJETIVOS.....	40
3.1	Geral .....	40
3.2	Específicos.....	40
4	RESULTADOS.....	41
4.1	Capítulo I.....	42

4.2	Capítulo II.....	47
4.3	Capítulo III .....	49
4.4	Capítulo IV .....	51
5	PERSPECTIVAS .....	55
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	57
	REFERÊNCIAS .....	58
	ANEXO .....	67

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Vírus Linfotrópico de Células T Humanas (HTLV)

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) foi o primeiro retrovírus humano identificado, a partir de um paciente com linfoma cutâneo de células T, nos Estados Unidos da América em 1979 (POIESZ et al, 1980). Na mesma época, pesquisadores japoneses isolaram e caracterizaram o mesmo vírus, que passou a ser classificado como vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) (HINUMA et al, 1981). Posteriormente, em 1982, foi identificado o vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2 (HTLV-2), numa linhagem imortalizada de células T obtidas de um paciente com tricoleucemia (KALYANARAMAN et al, 1982). Em 2005, foram identificados o vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 3 (HTLV-3) e vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 4 (HTLV-4), em populações do sul de Camarões (WOLFE et al, 2005).

Estudos sugerem que o HTLV pode ter emergido, na África, do contato entre humanos e primatas não-humanos infectados com o vírus linfotrópico de células T de símios (STLV). A África é o único continente onde todos os vírus linfotrópicos de células T de primatas (PTLV) foram isolados, e acredita-se que o HTLV foi levado ao novo mundo (Caribe, Estados Unidos e América do Sul) pelos negros africanos durante o período de tráfico de escravos no século XVI (COURGNAUD et al, 2004; SANTOS; LIMA, 2005; VERDONCK et al, 2007). O HTLV pertence à família *Retroviridae*, à subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus*.

#### 1.1.1 Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do Tipo 1 (HTLV-1)

Dados epidemiológicos sugerem que a infecção pelo HTLV-1 tem distribuição mundial, no entanto, algumas regiões são consideradas áreas endêmicas, como o sudoeste do Japão (YAMAGUCHI, 1994; Mueller et al, 1996), alguns países no Caribe

(HANCHARD et al, 1990), África sub-Saara (GESSAIN; de THE, 1996) e áreas localizadas no Irã e Melanésia (MUELLER, 1991) (Figura 1). O Japão e a África exemplificam a não homogeneidade da infecção, e são considerados os continentes com maior número de indivíduos infectados pelo HTLV-1, seguido da América do Sul (GESSAIN; CASSAR, 2012).

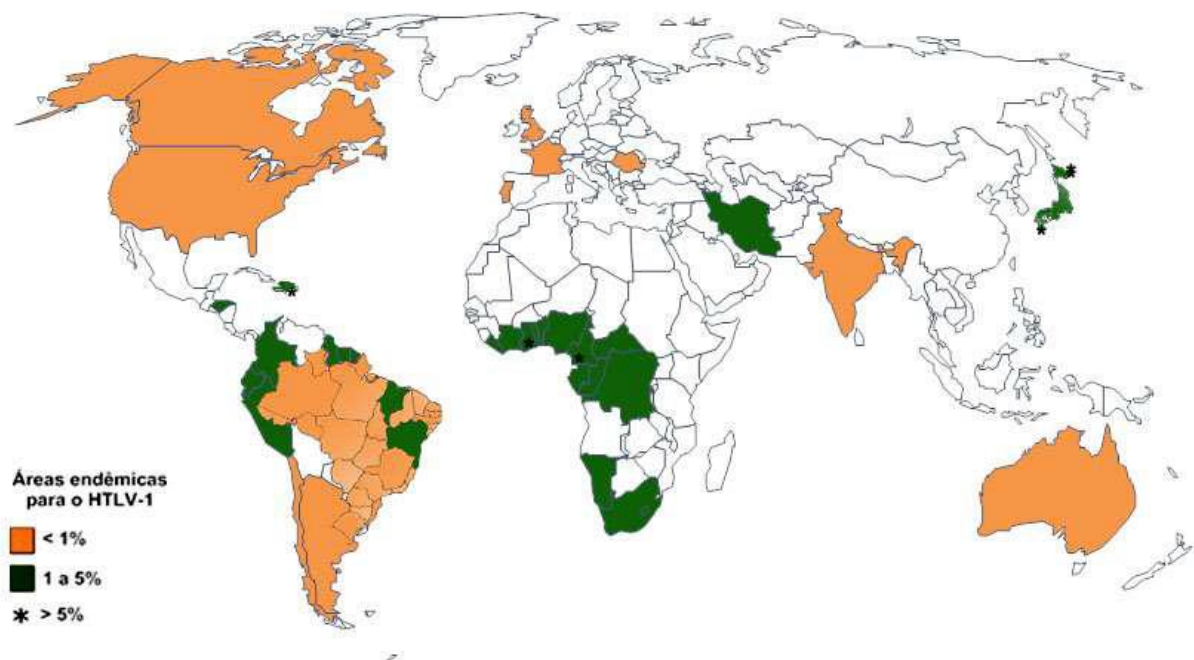


Figura 1. Distribuição do HTLV-1 no mundo. Adaptado de (PROIETTI, 2006).

Estima-se que aproximadamente 5-10 milhões de pessoas estão infectadas pelo HTLV-1 no mundo (DE THE; KAZANJI, 1996). No Brasil, a infecção pelo HTLV-1 atinge, aproximadamente, 2,5 milhões de pessoas (CARNEIRO-PROIETTI et al, 2002; CATALAN-SOARES et al, 2004), e apesar da escassez dos dados epidemiológicos, também se pode observar o fenômeno de distribuição heterogênea da infecção, sendo as maiores prevalências observadas, em doadores de sangue, nos estados do Maranhão, Bahia, Pará e Pernambuco (CATALAN-SOARES et al, 2005) (Figura 2). Considerando a população total, Salvador apresenta uma prevalência de 1,8 % de indivíduos infectados pelo HTLV-1 (DOURADO et al, 2003).

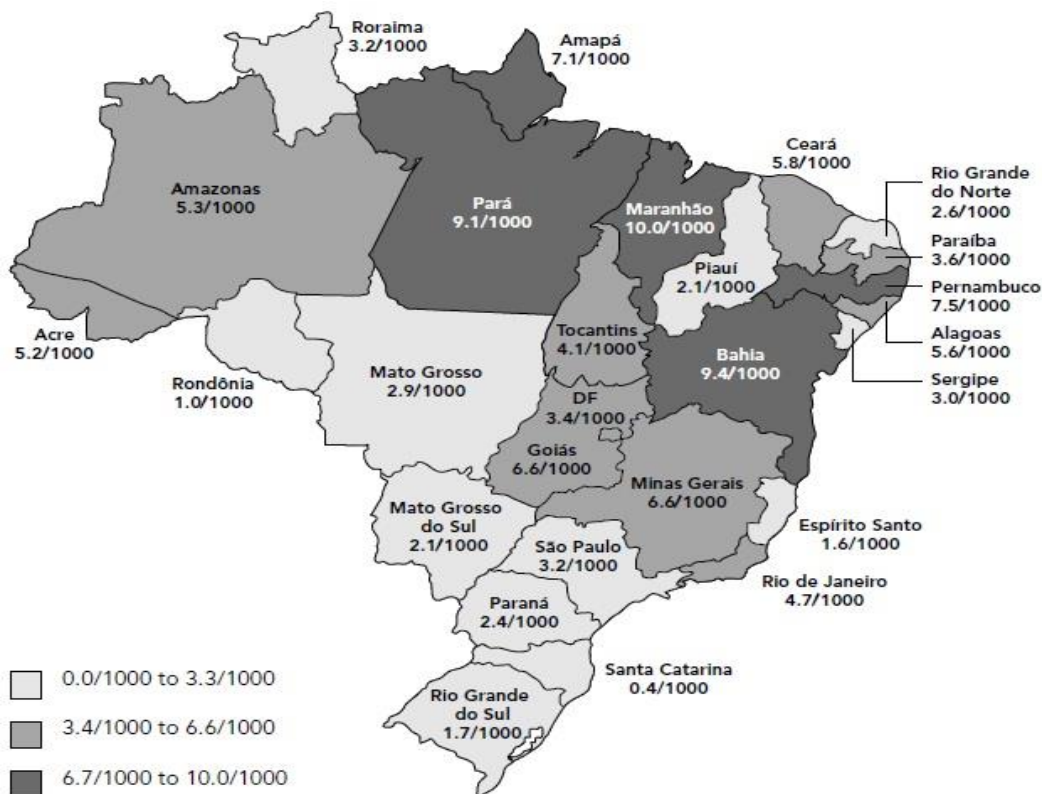


Figura 2. Mapa da prevalência de Elisa positivo para HTLV-1 em doadores de sangue no Brasil. Adaptado de (CATALAN-SOARES et al, 2005).

Estudos de epidemiologia molecular realizados a partir da análise da região LTR (*long terminal repeat*) e do gene *env* (envelope) possibilitaram classificar o HTLV-1 em sete subtipos virais: HTLV-1a (MIURA et al, 1994), HTLV-1b (HAHN et al, 1984; VANDAMME et al, 1994), HTLV-1c (GESSIAN et al, 1991), HTLV-1d (CHEN et al, 1995; MAHIEUX et al, 1997), HTLV-1e (SALEMI et al, 1998), HTLV-1f e HTLV-1g (WOLFE et al, 2005). O subtipo HTLV-1a possui distribuição mundial, e é também chamado de subtipo Cosmopolita. Já os outros seis subtipos são encontrados em regiões geográficas específicas, conforme figura 3.



Figura 3. Distribuição dos subtipos do HTLV-1 no mundo. Adaptado de (ARAÚJO, 2012).

### 1.1.2 Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do Tipo 2 (HTLV-2)

Estudos filogenéticos baseados na análise da região LTR e do gene *env* do HTLV-2 possibilitaram a classificação desse retrovírus em quatro subtipos: HTLV-2a, HTLV-2b (HALL et al, 1992), e HTLV-2c (EIRAKU et al, 1996) e HTLV-2d (VANDAMME et al, 1998). O subtipo c é característico do Brasil, e corresponde a um cluster filogenético do subtipo a, porém com uma proteína Tax de mesmo tamanho da proteína dos isolados do subtipo b (25 aminoácidos a mais que a proteína Tax nos isolados do subtipo a) (EIRAKU et al, 1996).

A infecção pelo HTLV-2 não possui distribuição cosmopolita, e apresenta-se de forma endêmica em determinadas regiões geográficas. Atinge, principalmente, usuários



de drogas injetáveis (UDIs), tribos indígenas (VANDAMME et al, 2000) e populações africana remotas (ROUCOUX; MURPHY, 2004).

O subtipo HTLV-2a possui elevada prevalência nas Américas e Europa, enquanto o HTLV-2b é encontrado com mais frequência na África e nas Américas. Já o subtipo HTLV-2c, apresenta-se como uma assinatura do Brasil, já que é encontrado somente nessa localidade. O HTLV-2d, encontrado somente na África Central, foi isolado a partir de dois pigmeus da tribo *Efe Bambuti* (figura 4).



Figura 4. Distribuição dos subtipos do HTLV-2 no mundo. Adaptado de (ROUCOUX; MURPHY, 2004).

## 1.2 Vias de Transmissão

A transmissão do HTLV ocorre por duas vias: horizontal, através do contato sexual, transfusão de sangue, uso de seringas, ou perfuro cortantes contaminados; ou

vertical, por meio da amamentação, transmissão transplacentária, ou durante o parto (CARNEIRO-PROIETTI et al, 2002).

### 1.3 Manifestações Clínicas

#### 1.3.1 Associadas ao HTLV-1

O HTLV-1 foi inicialmente associado com a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL), primeira manifestação clínica humana identificada como sendo causada por um retrovírus (YOSHIDA et al, 1982). Posteriormente, a infecção pelo HTLV-1 foi associada com as patologias neurológicas paraparesia espástica tropical (TSP) e mielopatia associada ao HTLV (HAM) (GESSAIN et al, 1985), as quais em 1988, foram admitidas por Román e Osame, serem manifestações complementares, compondo, na verdade, uma síndrome neurológica, hoje conhecida como HAM/TSP.

A ATLL é um linfoma/leucemia agressivo, que tem seu curso clínico classificado em quatro estágios: aguda, crônica, linfoma e *smouldering* (SHIMOYAMA, 1991). Além desses tipos clínicos, existe ainda outra categoria conhecida como ATLL cutânea, cujas manifestações são restritas à pele, e que posteriormente foi subdividida em duas outras classificações: tumoral e eritematosa (BITTENCOURT et al, 2007). A ATLL caracteriza-se pela infiltração de células T CD4<sup>+</sup> malignas nos linfonodos, baço, trato gastro-intestinal e pele, além da presença de células T anormais com núcleo lobulado ou em forma de flor (*flower cells*) (MATSOUKA, 2005). A proporção de ocorrência de ATLL em homens e mulheres infectados no Japão é de seis a dois por cento, respectivamente (YASUNAGA; MATSOUKA, 2007).

A HAM/TSP, por sua vez, caracteriza-se por uma mielopatia lentamente progressiva, que tem como consequência a paraparesia dos membros inferiores, espasticidade e hiperreflexia (ROMAN; OSAME, 1988). Esta patologia, considerada uma doença de baixa letalidade, está presente em um a cinco por cento dos pacientes infectados pelo vírus, e atinge frequentemente mais as mulheres que os homens

(KAPLAN et al, 1990). Apesar de ainda não ser completamente esclarecida, existem três hipóteses que buscam explicar a patogênese da HAM/TSP. A primeira hipótese sugere que linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos anti-HTLV-1 atravessariam a barreira hematoencefálica e destruiriam as células da glia infectadas pelo HTLV-1, através de mecanismos de citotoxicidade direta (NAKAMURA et al, 1993). A segunda hipótese envolve um processo de mimetismo molecular entre o antígeno Tax e uma proteína neuronal, que acarretaria em um processo inflamatório autoimune com consequente lesão neuronal (LEVIN et al, 2002).

A hipótese mais aceita propõe que a patogênese da HAM/TSP esteja relacionada com a desmielinização local atribuída à invasão de linfócitos infectados no sistema nervoso central, e o desencadeamento de uma resposta inflamatória crônica com destruição tecidual. Esse processo ocorreria a partir de células T CD4<sup>+</sup> infectadas com o HTLV-1 e linfócitos T CD8<sup>+</sup> específicos anti-Tax que migrariam através da barreira hematoencefálica, e provocariam a destruição das células da glia pelas citocinas liberadas pelos CTLs contra as células T CD4<sup>+</sup> infectadas (OSAME, 2002).

O HTLV-1 também está associado a outras patologias, como dermatite infecciosa associada ao HTLV-1 (GONÇALVES et al, 2003), uveíte associada ao HTLV (HAU) (MOCHIZUIKI et al, 1992), além de doenças reumáticas, como síndrome de *Sjögren* e artrite reumatóide (NISHIOKA, 1996; McCALLUM et al, 1997) e ao aumento da susceptibilidade a algumas parasitoses.

A infecção pelo HTLV-1 não necessariamente implica no desenvolvimento de processos patológicos. Acredita-se que a maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanece assintomática, e ainda não se sabe o que determina a manifestação da doença num indivíduo infectado. Estudos apontam que a carga proviral e a resposta imune normalmente apresentam-se elevadas em indivíduos sintomáticos, quando comparados com indivíduos assintomáticos. Tem sido sugerido que essa resposta imunológica é influenciada pela via de infecção do hospedeiro (mucosa ou sangue periférico), além de fatores genéticos individuais como polimorfismos em genes de HLA (*Human Leucocitary Antigen*) e genes envolvidos na resposta imune (PROIETTI, 2006). Além disso, a análise de indivíduos, com diferentes *status* clínico, mas apresentando níveis semelhantes de carga proviral, demonstrou que células de pacientes assintomáticos produzem menores níveis das citocinas inflamatórias: TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (NISHIMURA et al, 2000), sugerindo que esta baixa produção seria importante para a

manutenção do estado assintomático, e que outros fatores, além da carga proviral, também devem influenciar a sintomatologia da infecção (FURUKAWA et al, 2003).

### 1.3.2 Associadas ao HTLV-2

O HTLV-2 é considerado um vírus de menor virulência, quando comparado ao HTLV-1, já que até o momento apenas o HTLV-1 teve associação comprovada com doenças humanas. Para avaliar a influência do HTLV-2 no desenvolvimento de doenças, estudos em condições de imunodeficiência foram realizados. Para tal, pacientes portadores da co-infecção HTLV-2/HIV-1 foram selecionados, já que o HTLV-2 possui a mesma forma de transmissão do HIV-1 e, portanto, essa co-infecção é encontrada frequentemente. Estes estudos sugerem que mesmo em indivíduos infectados com o HIV-1, a co-infecção pelo HTLV-2 não está associada com desenvolvimento de câncer ou doenças neurológicas, e demonstram inclusive que a essa co-infecção induz a diminuição da progressão para AIDS (BRITES et al, 2009).

Da mesma forma, resultados obtidos no *National Institutes of Health* (NIH) demonstram que macacos-rhesus expostos ao HTLV-2 também não desenvolvem doença, no entanto apresentam resposta imune humoral e celular, bem como soroconvertem e o DNA proviral pode ser detectado em tecidos linfóides e mucosas. Além disso, para descartar que o HTLV-2, causando proliferação espontânea de células-T, poderia exacerbar a infecção pelo vírus linfotrópico de células T de símios (STLV), foi testada a suscetibilidade de macacos-rhesus, previamente infectados com o HTLV-2, à infecção pelo STLV. Não foi encontrada nenhuma diferença nos níveis virais entre os macacos infectados somente com o STLV e aqueles co-infectados com o HTLV-2 e STLV. A partir desse trabalho também foi possível observar a persistência da infecção pelo HTLV-2, que sugere que esse retrovírus atenuado seja um potencial vetor no desenvolvimento de vacinas recombinantes (GORDON et al, 2010).

#### 1.4 Estrutura do HTLV-1

O HTLV-1 possui uma estrutura morfológica similar a de outros retrovírus. É constituída, basicamente, por um envelope, uma matriz protéica e um nucleocapsídeo. O envelope representa a superfície do vírion, e é composto por duas subunidades protéicas glicosiladas: a proteína de superfície (SU), denominada gp46, e a proteína transmembrana (TM), denominada gp21, que ancora a gp46. Logo após o envelope, encontra-se a matriz viral (MA), seguida do capsídeo (CA), que apresenta simetria icosaédrica e é composto principalmente por proteínas codificadas a partir do gene *gag*. No interior do capsídeo encontra-se o genoma viral, composto por duas fitas simples de RNA senso positivo, associadas às proteínas do nucleocapsídeo (NC). Além de outras proteínas, como a transcriptase reversa (RT) e a integrase (IN) (Figura 5).

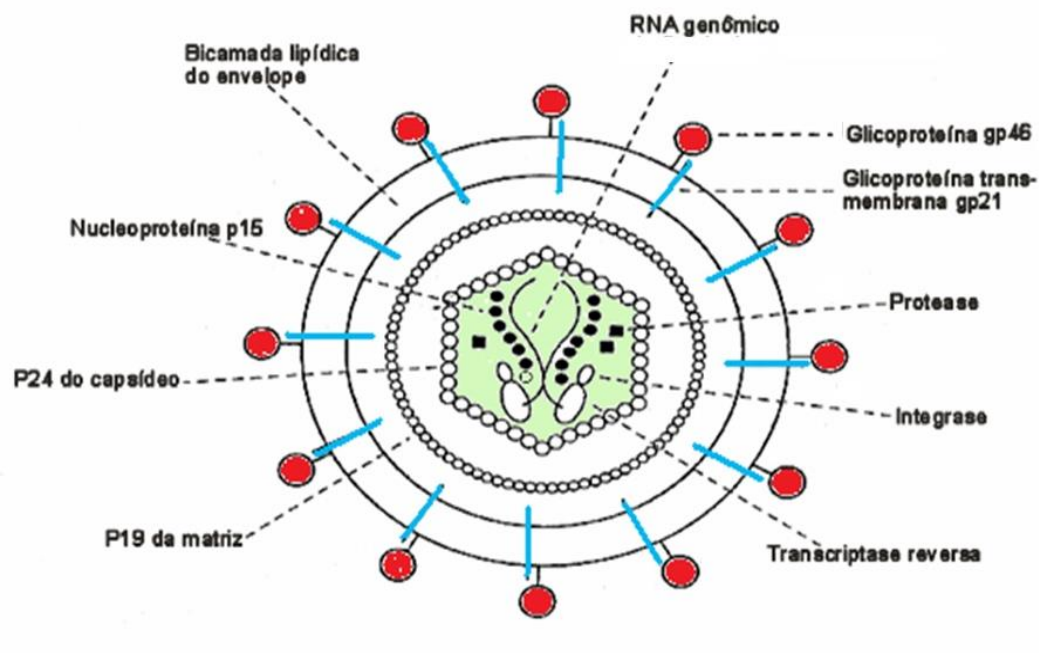


Figura 5. Estrutura morfológica do HTLV-1. Desenho esquemático adaptado de (SALEMI, 1999).

## 1.5 Organização Genômica do HTLV-1

O genoma viral localiza-se no interior do capsídeo e possui 9032 pb (SEIKI et al, 1983). É composto por duas fitas simples de RNA, que codificam os genes *gag* (grupo antigênico), *pro* (protease), *pol* (polimerase) e *env* (envelope), além de uma sequência próxima à extremidade 3', conhecida como região pX, a qual contém os genes regulatórios *tax* e *rex*. Similar a outros retrovírus, o mRNA transcrito a partir do gene *gag* codifica a proteína p55, que posteriormente é clivada em protease, p19, p24 e p15. Da mesma forma, o mRNA transcrito a partir do gene *env* codifica a proteína p63, que após a clivagem origina as proteínas do envelope gp46 e gp21. Em cada extremidade do genoma existem sequências de repetições terminais longas (LTR – *long terminal repeat*), que são essenciais na integração do DNA proviral ao DNA do hospedeiro, e também para a regulação transcricional do genoma do vírus (Figura 6) (GREEN; CHEN, 2001).

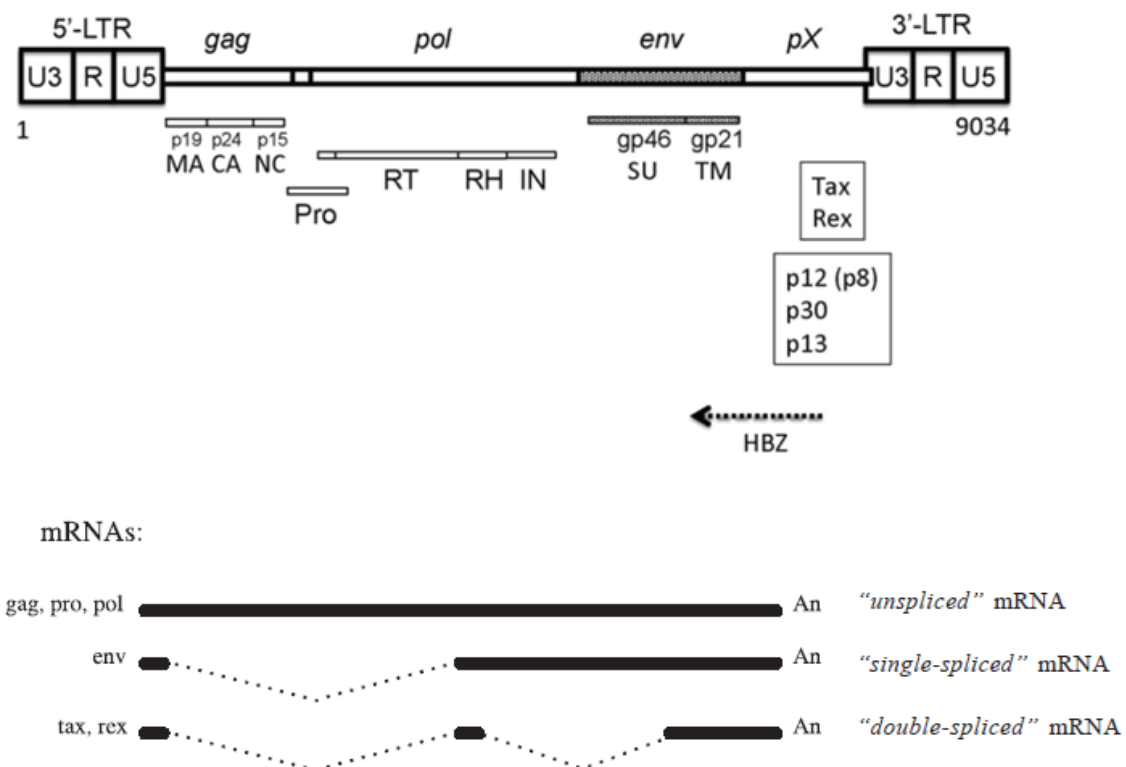


Figura 6. Estrutura genômica do HTLV-1 e processamentos de RNA. Desenho esquemático adaptado de (HOSHINO, 2012); (PROIETTI, 2006).

### 1.5.1 Região Promotora

A região LTR do HTLV-1 contém elementos virais promotores e regulatórios e exerce um papel fundamental na integração do genoma viral no genoma da célula hospedeira (GREEN; CHEN, 2001). Essa região divide-se em três subunidades: U3, R e U5. A região U3 possui elementos necessários para o controle da transcrição viral, como sítios de poliadenilação, *motif* TATA box, e três repetições de 21 pares de base (pb) conhecidas como Elementos Responsivos de Tax (TRE) (BRADY et al, 1987). Vale ressaltar que a proteína Tax não se liga especificamente a região TRE, mas interage com fatores de transcrição, como CREB/ATF, que reconhecem o *motif* CRE, localizado nessa região. A formação desse complexo possibilita o recrutamento de fatores co-ativadores p300/CBP, facilitando a estabilidade da ligação e conseqüentemente, estimulado à transcrição viral. A maioria dos *motifs* necessários para o controle da transcrição viral encontra-se na região U3 (BARBEAU; MESNARD, 2011).

Tem sido demonstrado que a transcrição viral é controlada pela ação de proteínas específicas, denominadas fatores de transcrição, como CREB/ATF, NF-Kb, SRF, entre outros, que se ligam especificamente a *motifs* presentes na região promotora. Da mesma forma, processos epigenéticos, como a metilação da região LTR também influenciam a expressão gênica. Trabalhos sugerem que a região LTR 5' é hipermetilada em relação à LTR 3', tanto para o HTLV-1 quanto para o HTLV-2. Devido a isso, a expressão gênica regulada pela LTR 3' mantém-se constante, ao contrário da expressão associada a LTR 5'. Logo, as proteínas HBZ (HTLV-1) e APH-2 (HTLV-2), que são controladas pela região LTR 3', possuem expressão contínua (GAUDRAY et al, 2002; HALIN et al, 2009).

É importante ressaltar que regiões denominadas *enhancer* (E Box) também regulam a transcrição gênica (EPHRUSSI et al, 1985). A região LTR do HTLV-1 possui uma única sequência E Box (CATATG), localizada 28 pb antes do TATA box (TERME et al, 2009). Estudos demonstram que mutações na região E Box podem aumentar ou diminuir a transcrição do Vírus da leucemia bovina (BLV), dependendo do tipo celular onde a mutação ocorreu. Esses estudos, realizados a partir de ensaios de mutagênese sítio dirigida sugerem que mutações pontuais que resultam na perda do

*motif* E Box aumentam a expressão de LTR e, portanto, esse *motif* seria responsável pela repressão da transcrição (MEREZAK et al, 2001).

A transcrição a partir da região LTR 5' gera uma molécula de RNA completa (9 kb), utilizada para a síntese dos produtos dos genes *gag*, *pro*, e *pol*. Um RNA subgenômico (4 kb) é sintetizado a partir de uma etapa única de processamento da molécula de RNA completa, e codifica as glicoproteínas do envelope viral (*env*). Da mesma forma, outra molécula de RNA (2 kb) é gerada após a remoção de dois *íntrons*, e codifica para as proteínas regulatórias da região pX (Figura 6) (RENDE et al, 2012).

### 1.5.2 Genes Estruturais

O gene *gag* corresponde os nucleotídeos 802 a 2019 no genoma do HTLV-1, e essa região é inicialmente traduzida como um precursor (p55), que após a clivagem origina as proteínas da matriz (p19), proteínas do capsídeo (p24), e a proteína do nucleocapsídeo (p15). A extremidade 3' do gene *gag* sobrepõe-se ao início do gene *pro*, que compreende a posição 2052 a 2755 no genoma do HTLV-1. O gene *pro* codifica a enzima protease (PR), que atua no processo de clivagem das cadeias polipeptídicas originando proteínas maduras (JOHNSON et al, 2001).

O gene *pol*, por sua vez, localiza-se na posição 2497 a 5187 no genoma do HTLV-1, e é responsável por codificar enzimas importantes, como a transcriptase reversa (TR), que atua na síntese do DNA viral a partir da molécula de RNA, e a integrase (IN), fundamental no processo de integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira (PROIETTI, 2006).

O gene *env* corresponde a sequência de nucleotídeos localizada na posição 5180 a 6647 no genoma do HTLV-1, e assim como o gene *gag*, codifica inicialmente um precursor. Esse precursor (gp63) é clivado entre a posição 6117-6118 para gerar uma glicoproteína transmembrana (gp21) e uma glicoproteína de superfície (gp46). Assim como em outros retrovírus, a glicoproteína transmembrana ancora, através de associações não covalentes, a glicoproteína de superfície na bicamada lipídica do envelope. Dessa forma, a gp21 e gp46 ficam expostas ao sistema imune e, conseqüentemente, estão associadas à resposta humoral e celular (DELAMARRE et al,



1996; MANEL et al, 2004).

### 1.5.3 Genes Regulatórios

A região pX do genoma do HTLV-1 é responsável por codificar proteínas regulatórias e acessórias importantes durante os mecanismos de replicação viral. A transcrição dessa região resulta em formas alternativas de RNA mensageiro, que possuem quatro fases de leitura aberta (ORFs), conforme figura 7.

As proteínas acessórias p12 (ORF I), p13 e p30 (ORF II) contribuem para a infectividade viral, manutenção de altas cargas virais, ativação das células do hospedeiro e regulação da transcrição gênica (BINDHU et al, 2004).

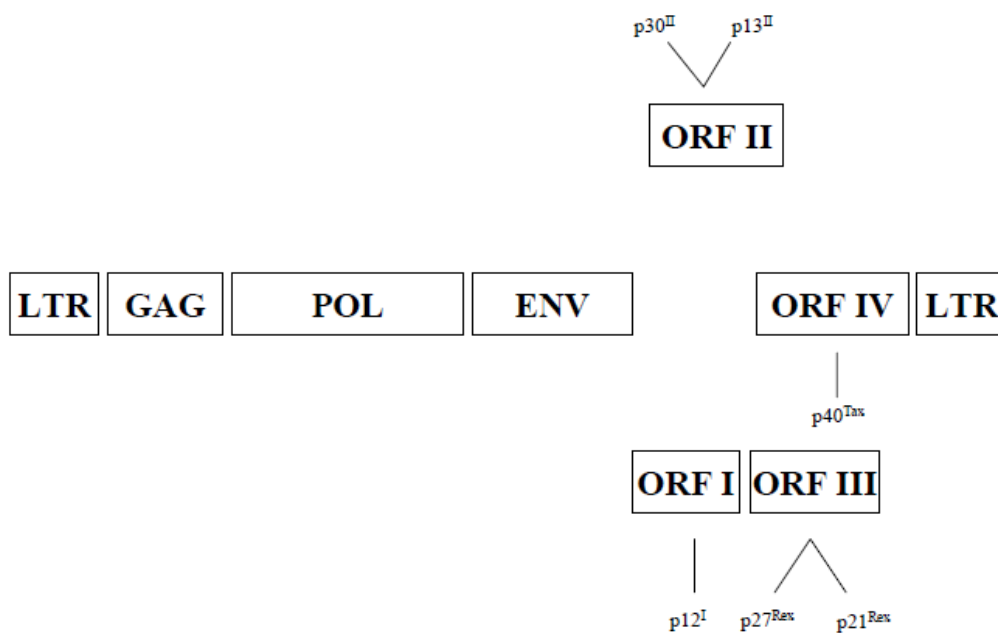


Figura 7. Representação esquemática da região pX do genoma do HTLV-1. Adaptado de (JOHNSON et al, 2001).

Já a ORF III codifica uma importante proteína regulatória, denominada proteína Rex. Essa proteína é considerada essencial para a regulação da expressão gênica viral através de eventos pós-traducionais. Rex é indispensável para a eficiente multiplicação,

infecção e disseminação viral, além de regular a indução das diferentes fases do ciclo celular do HTLV-1 (YOUNIS; GREEN, 2005).

A ORF IV, por sua vez, codifica a proteína regulatória viral mais importante, pois atua como agente principal no desenvolvimento de diversas patologias associadas ao HTLV-1. Essa proteína, denominada proteína Tax, é essencial para a replicação viral e para a transformação celular, através da sua interação com fatores de transcrição celulares de e com a região LTR (PROIETTI, 2006). Tax pode ser encontrada tanto no núcleo, como no citoplasma da célula e, além de regular a transcrição viral, pode aumentar a expressão de citocinas e receptores envolvidos no crescimento e proliferação celular (SMITH; GREENE, 1992; TSCHACHLER et al, 1993). Da mesma forma, Tax é capaz de reprimir a ação de genes celulares envolvidos na inibição do crescimento celular, bem como inibir o reparo do DNA e os eventos de apoptose (FRANCHINI, 1995).

É importante ressaltar que além de regular processos virais, a proteína Tax e a proteína Rex podem interferir em funções da célula hospedeira, ao afetar a transcrição e tradução de diversos genes endógenos (FRANCHINI, 1995).

Recentemente, foi identificado na região pX o gene HTLV-1 *bZIP factor gene* (HBZ), codificado pela fita negativa, sob o controle da região LTR 3' (MATSOUKA; GREEN, 2009). Estudos sugerem que o HBZ pode atuar tanto como molécula de RNA, quanto em sua forma protéica, e tem como principal função a regulação da transcrição viral, e o aumento da proliferação das células T (MESNARD et al, 2006). Além disso, a proteína HBZ inibe a transativação da transcrição viral mediada por Tax, por se heterodimerizar com fatores de transcrição da família CREB (MATSOUKA, 2005).

## **1.6 Ciclo de Disseminação do HTLV-1**

A replicação clássica dos retrovírus ocorre, basicamente, em nove etapas: adsorção do vírus; fusão da membrana da célula hospedeira com o envelope viral; internalização da partícula viral; transcrição reversa do genoma viral; inserção do DNA linear no genoma da célula hospedeira; síntese de RNA viral; tradução das proteínas virais; montagem do capsídeo; e brotamento (Figura 8).

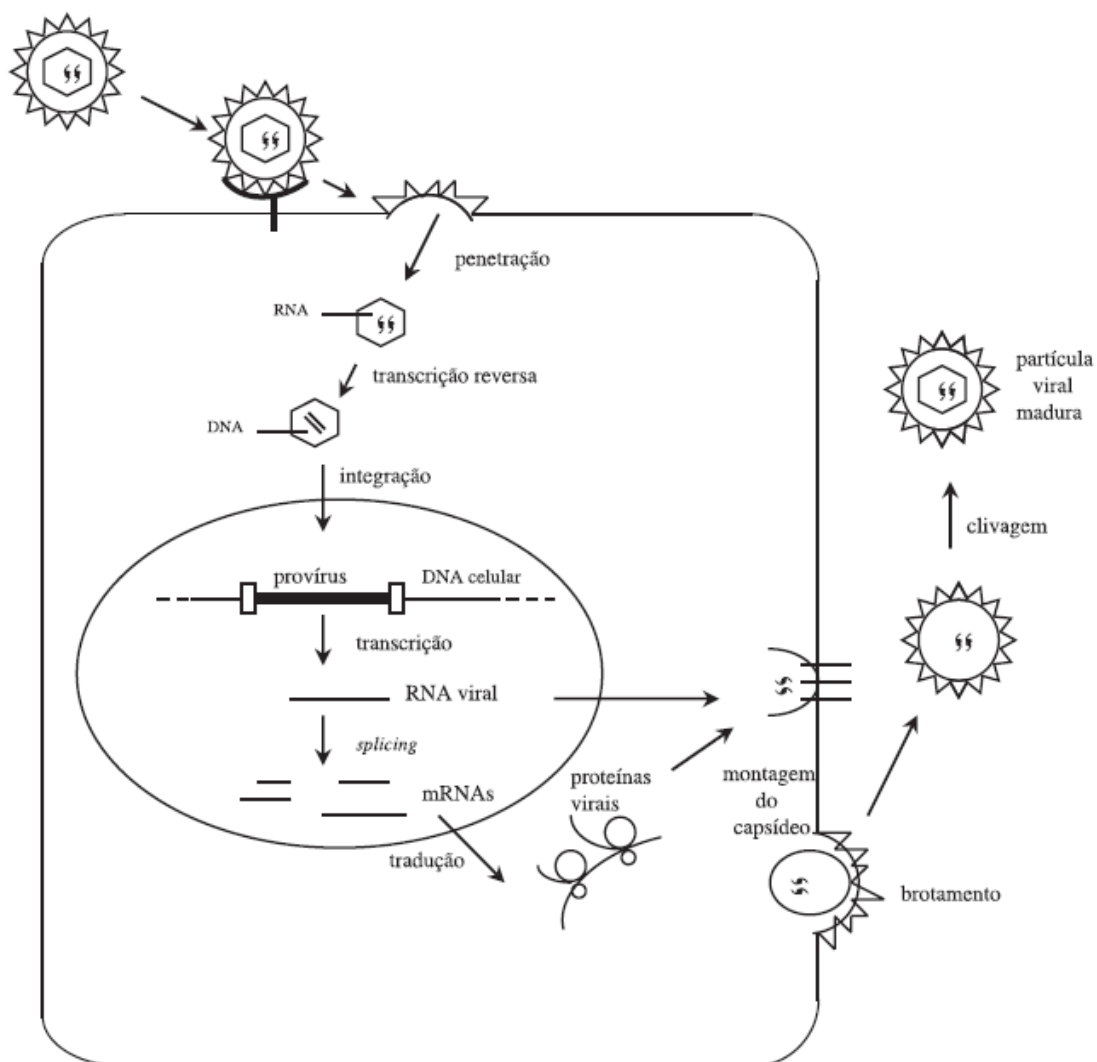


Figura 8. Ciclo de replicação clássica dos retrovírus (PROIETTI, 2006).

A glicoproteína de superfície, gp46, está intimamente associada à primeira etapa do ciclo clássico de replicação, pois se liga a moléculas na superfície celular, incluindo proteoglicanos heparan-sulfato, neuropilina-1, e um transportador de glicose de classe 1 (GLUT-1), permitindo a fusão da glicoproteína transmembranar viral (gp21) e iniciando a fusão das membranas viral e celular (Figura 9) (PINON et al, 2003; MANEL, 2005; GHEZ et al, 2006).

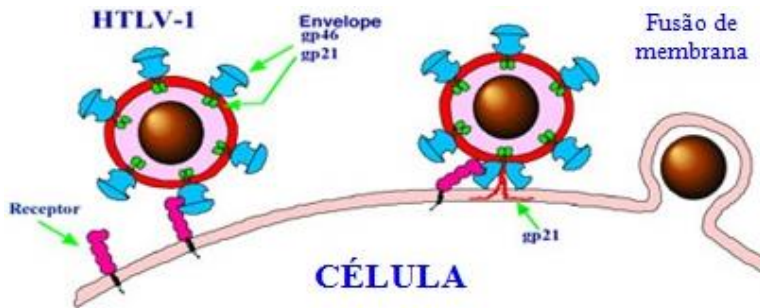


Figura 9. Contribuição da gp46 no ciclo de replicação do HTLV-1. Adaptado: [www.dundee.ac.uk/biomedres/brighty.htm](http://www.dundee.ac.uk/biomedres/brighty.htm).

Estudos recentes têm sido desenvolvidos com o propósito de avaliar a relação dos receptores com a entrada da partícula viral na célula hospedeira. Acredita-se que para uma internalização viral eficiente, seja necessária uma cooperação entre os receptores proteoglicanos heparan-sulfato, neuropilina-1, e o GLUT-1, formando um complexo receptor (JONES et al, 2011).

Entretanto, ao contrário de outros retrovírus, a replicação do HTLV-1 ocorre, principalmente, devido à expansão clonal das células infectadas, via mitose, e não via modelo clássico dos retrovírus (WATTEL et al, 1995; CIMARELLI et al, 1996). Logo, o HTLV-1 não utiliza com frequência a transcriptase reversa, descrita na literatura como enzima com altas taxas de erros (PRESTON; DOUGHERTY, 1996). Esses erros resultam em mutações, que diminuem a estabilidade do genoma viral. Portanto, o HTLV-1 é um retrovírus estável, quando comparado com outros retrovírus, como o HIV.

Além disso, o HTLV-1 pode induzir eventos de polarização das células facilitando a passagem de proteínas e do genoma viral, num fenômeno conhecido como sinapse viral (BANGHAM, 2003). Quando uma célula infectada entra em contato com outra célula não infectada ocorre a formação de um canal protéico na junção célula-célula, formando a interface onde ocorrerá a sinapse viral (Figura 10). A formação desta estrutura permite o acúmulo de proteínas codificadas a partir do gene *gag* e de material genômico na interface da sinapse, culminando com a passagem desse material para a célula não infectada (MATSUOKA; JEANG, 2007). O reconhecimento entre a célula infectada e a célula não infectada é promovido pela gp46. Manel e colaboradores (2005)

demonstraram, inclusive, que nestas áreas de “sinapse viral” há um acúmulo de moléculas de GLUT 1, conhecidas por seu papel no reconhecimento celular.

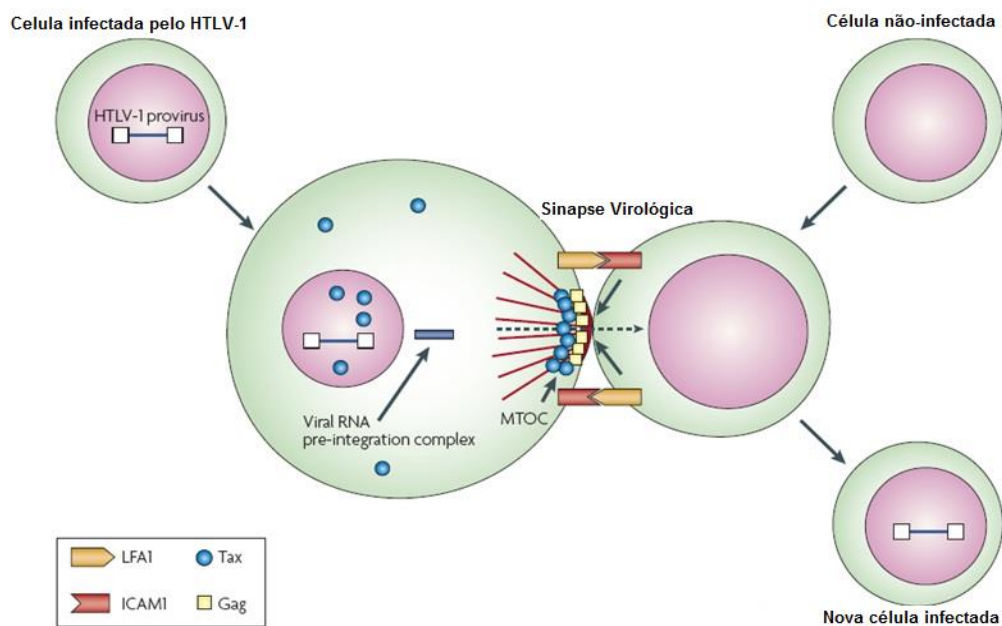


Figura 10. Sinapse Viral. Adaptado de (MATSUOKA; JEANG, 2007).

Além da disseminação viral através do modelo clássico, expansão clonal e sinapse virológica, recentemente o HTLV-1 foi detectado em estruturas ricas em carboidratos, semelhantes a biofilmes, presentes na superfície de células infectadas. Essas estruturas favorecem o contato entre linfócitos infectados e linfócitos não-infectados, facilitando a transmissão viral (PAIS-CORREIA et al, 2009) (Figura 11).

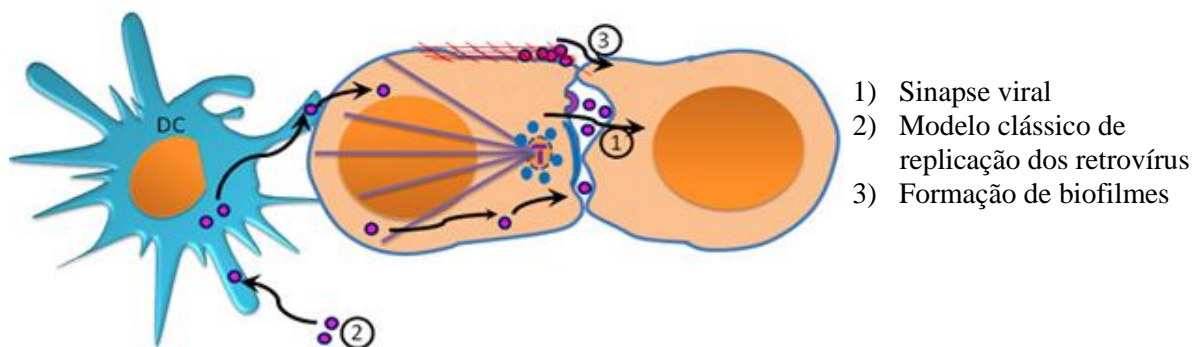


Figura 11. Disseminação viral através da formação de biofilmes. DC: Células Dendríticas. Adaptado de (NEJMEDDINE; BANGHAM, 2010).

Em 2010, Nancy Van Prooyen e colaboradores detectaram proteínas virais, como p8 e proteínas traduzidas a partir dos genes *env* e *gag*, em conduítes formados entre linfócitos infectados e linfócitos não-infectados, sugerindo, portanto, um novo modelo de disseminação viral utilizado pelo HTLV-1 (Figura 12).

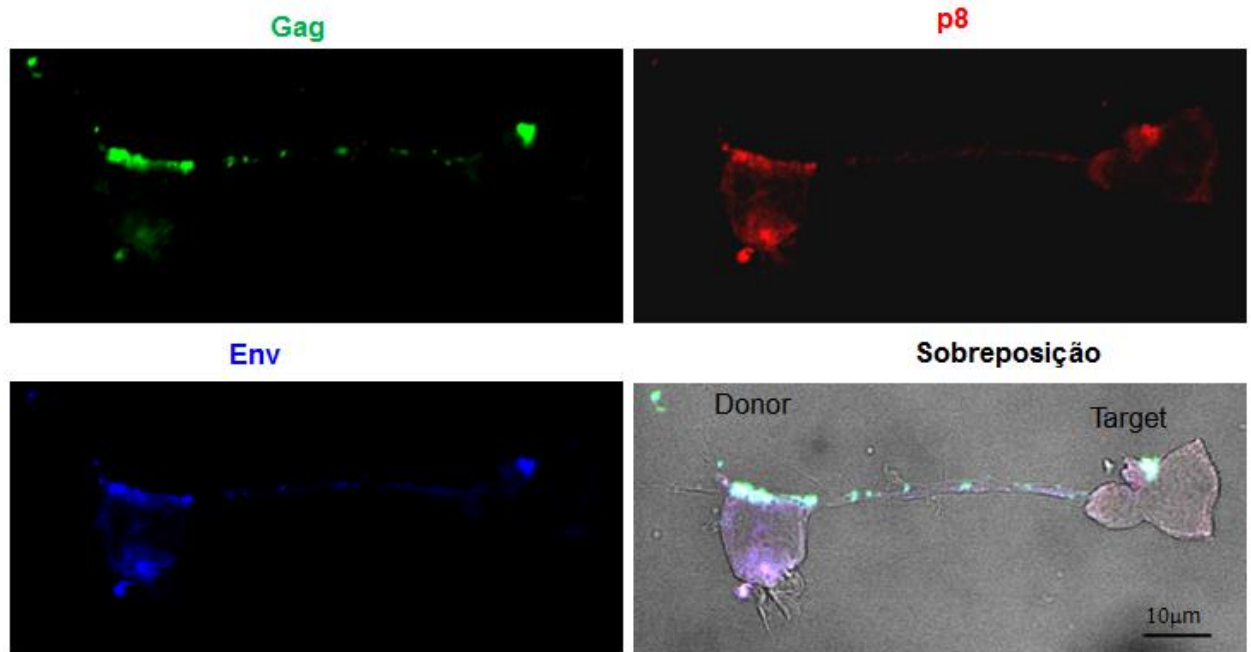


Figura 12. Formação de Conduítes. Adaptado de (VAN PROOYEN et al, 2010).

Vale ressaltar que embora o HTLV-1 apresente um tropismo por células T CD4<sup>+</sup>, ele é capaz de infectar células T CD8<sup>+</sup> (HANON et al, 2000), e outras células não-T, incluindo monócitos e linfócitos B (KOYANAGI et al, 1993), macrófagos (NATH, 2002), células dendríticas (KNIGHT et al, 1993) e endoteliais (SETOYAMA et al, 1998). Já o HTLV-2 possui maior tropismo por células T CD8<sup>+</sup>.

### 1.7 Resposta Imune na Infecção pelo HTLV-1

A resposta imune contra a infecção pelo HTLV-1 pode ser categorizada em dois grandes grupos: resposta imune inespecífica (inata) e específica (adaptativa). A resposta imune inata ocorre de maneira rápida, a partir da ação de neutrófilos e monócitos,

ativação de células *Natural Killer* (NK), bem como ativação do sistema complemento (PROIETTI, 2006). Embora os mecanismos da atividade inata sejam de extrema importância no momento inicial da infecção, é a resposta imune adaptativa que exerce o papel mais relevante durante infecções crônicas, como a infecção pelo HTLV-1 (LAL et al, 1992).

Durante a infecção viral, os linfócitos B interagem com proteínas do HTLV-1, através dos receptores de células B (BRC), também denominados imunoglobulinas de membrana, internalizando as estruturas antigênicas. Em seguida, esses linfócitos B transformam-se em plasmócitos e secretam imunoglobulinas específicas anti-HTLV-1, com o intuito de neutralizar ou opsonizar o vírus (PROIETTI, 2006).

No âmbito da resposta imune humoral, o gene *env* tem fundamental importância, já que a maioria dos anticorpos produzidos em resposta à infecção natural pelo HTLV-1 inclui aqueles direcionados contra as glicoproteínas do envelope. Sabe-se inclusive que a região central da gp46 é responsável por induzir 90% dos anticorpos anti-*env* que são produzidos nos indivíduos infectados (SHERMAN et al, 1993). Isso ocorre porque após a infecção as proteínas do envelope são expressas na superfície das células infectadas e são, portanto, reconhecidas pelo hospedeiro no curso da resposta imune.

Dessa forma, indivíduos infectados pelo HTLV-1 desenvolvem uma resposta imune significativa contra os produtos proteicos do gene *env*. Entretanto, apesar da elevada resposta imune anti-*env* os primeiros anticorpos específicos anti-HTLV-1 detectados são anti-*gag* e, portanto, outras proteínas também podem ser utilizadas como marcadores da infecção, tais como a proteína p19 e p24. Trabalhos recentes têm demonstrado o aumento na expressão do antígeno viral p19 com o aumento da proliferação das células infectadas (XIE; Green, 2005).

Simultaneamente ao mecanismo da resposta imune humoral, inicia-se a ativação da resposta imune celular, através da participação das células apresentadoras de antígenos (APCs). As APCs mais importantes nesse processo são os monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, que após o processamento do antígeno, via fagolisossoma, apresentam os peptídeos processados através do complexo MHC-II/peptídeo para os linfócitos T CD4<sup>+</sup>. É importante ressaltar que a interação da APC com o linfócito T dependerá da ligação específica com o Receptor de Superfície de Células T (TCR), da presença da molécula CD4<sup>+</sup>, bem como de moléculas coativadoras (PROIETTI, 2006).

As células T CD4<sup>+</sup> ativadas possuem como função principal a produção de citocinas e, conseqüentemente, a ativação e potencialização das respostas imunológicas, incluindo a produção de anticorpos e a resposta citotóxica. Essa resposta citotóxica, realizada pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> ocorre a partir da liberação de citotoxinas capazes de lisar a célula infectada (Figura 13).

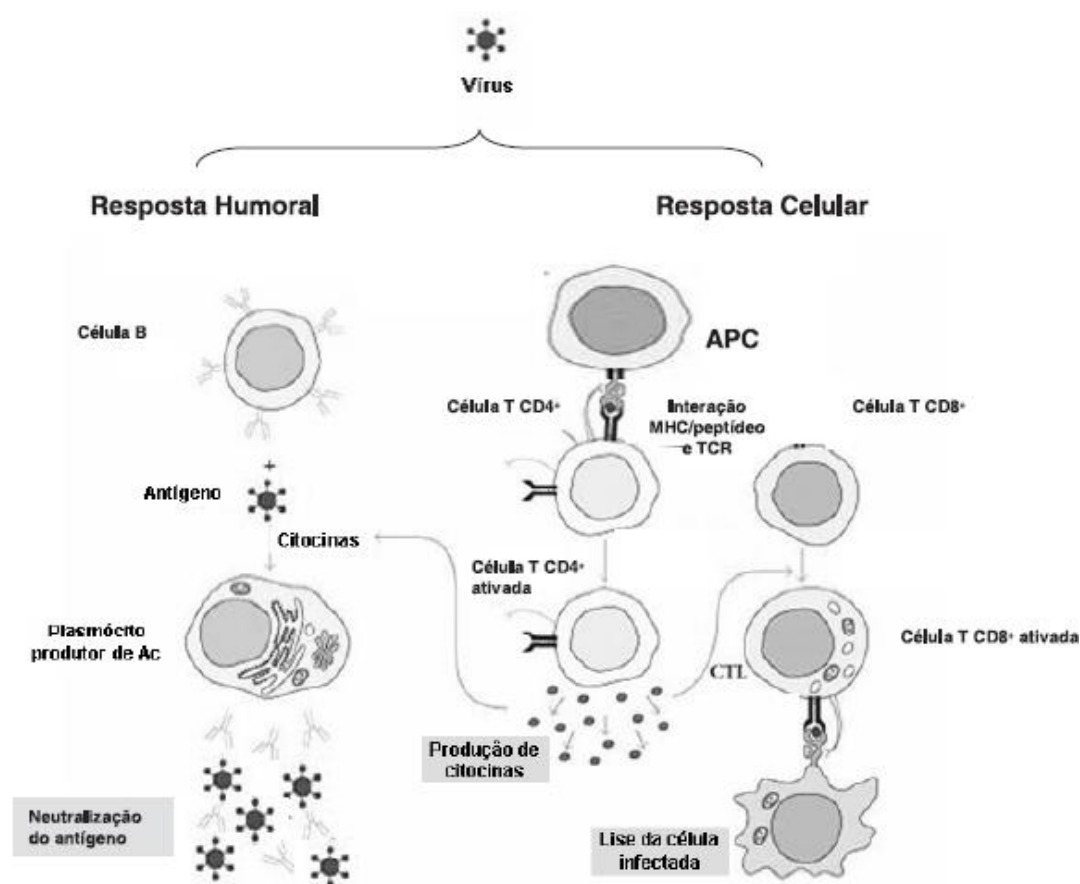


Figura 13. Ativação da resposta imune adaptativa (PROIETTI, 2006).

## 1.8 Diagnóstico Sorológico e Tratamento

O diagnóstico sorológico da infecção pelo HTLV parte do pressuposto de que a maioria das proteínas virais é imunogênica e que, portanto, anticorpos são produzidos para reagir contra elas. Estes anticorpos são detectados no soro de pessoas infectadas pelo HTLV, através de testes sorológicos, como ELISA e *Western Blot* (WB)



(CONSTATINE et al, 1992). Esses ensaios de triagem detectam anticorpos contra os produtos dos genes *env* e *gag* do HTLV-1 e HTLV-2. Entretanto, estudos têm demonstrado que o WB pode frequentemente falhar na detecção de anticorpos contra os produtos do gene *env*. Algumas amostras podem ter resultado positivo no WB, mas sem diferenciação entre o HTLV-1 e HTLV-2, e são consideradas não-tipadas. Nesses casos, para que se obtenha um diagnóstico mais seguro e específico, é necessária uma combinação de testes, como a detecção molecular através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o que contribui para o alto custo e para a demora na conclusão do diagnóstico (LAL et al, 1992).

Posteriormente ao diagnóstico, o paciente deve ser acompanhado para verificação de desenvolvimento de sintomatologia. Até o momento não foi descrita nenhuma terapia específica eficaz na cura da infecção pelo HTLV-1. Dessa forma, os pacientes que desenvolvem manifestações clínicas devem ser tratados especificamente a partir de metodologias paliativas, como tratamentos fisioterápicos e/ou medicamentosos.

## **1.9 Desenvolvimento de Vacinas**

### **1.9.1 Perspectiva Histórica**

A história das vacinas e sua aplicação no combate a doenças infecciosas acumula mais de 200 anos, desde que pesquisadores como Edward Jenner e Louis Pasteur iniciaram seus estudos. A partir de experimentos relativos à varíola, na época uma das doenças mais temidas pela humanidade, Edward Jenner extraiu o conteúdo líquido da mão de uma mulher que havia contraído a varíola bovina e o inoculou em um menino saudável, em maio de 1796. O menino contraiu a doença de forma branda e logo ficou curado. Em julho, Jenner inoculou no mesmo menino o líquido extraído de uma pústula de varíola humana. A criança não contraiu a doença, o que significava que estava imune à varíola (SMITH, 2011).

Em 1880, o cientista francês Louis Pasteur iniciou seus estudos sobre a raiva e

em 1885 aplicou pela primeira vez a vacina em um ser humano. A descoberta da vacina anti-rábica trouxe a consagração definitiva dos trabalhos de Pasteur e propiciou a criação, em 1888, em Paris, do Instituto que leva seu nome, um dos mais importantes centros mundiais de pesquisa científica (BERCHE, 2012).

Desde então, o desenvolvimento da pesquisa vacinal desenvolveu-se buscando empregar fragmentos cada vez menores do patógeno, a fim de aumentar a segurança da vacina, sem diminuir a eficácia da mesma. Dessa forma, é possível categorizar as vacinas em três grupos: primeira geração; segunda geração; e terceira geração (DINIZ; FERREIRA, 2010).

As vacinas de primeira geração incluem as compostas pelo agente patogênico completo, porém atenuado através de tratamentos químicos, ou inativado, onde o patógeno é transformado em uma forma não patogênica. As vacinas humanas produzidas a partir de microrganismos derivados de outros hospedeiros também fazem parte dessa categoria, como as vacinas contra a varíola (FENNER et al, 1988), tuberculose (BARRETO et al, 2006), sarampo, rubéola, entre outras.

A segunda geração baseia-se na indução da formação de anticorpos contra um único alvo do patógeno, como uma toxina ou moléculas superfícies, que possibilitam o reconhecimento do sistema imune e conseqüente neutralização ou eliminação do agente patogênico. Essa geração permite que o indivíduo vacinado desenvolva uma resposta imunológica mais rápida, capaz de impedir a propagação do microrganismo, como as vacinas contra a hepatite B, meningite, antitetânicas, antidiftéricas, entre outras.

Já as vacinas de terceira geração, denominadas de vacinas de DNA, utilizam apenas a informação genética do patógeno responsável pela codificação dos antígenos relevantes para o reconhecimento do sistema imunológico do hospedeiro. Testes clínicos realizados com as vacinas de DNA sugerem uma boa resposta citotóxica e, portanto, uma possível aplicação para o controle de patógenos de replicação intracelular (DINIZ; FERREIRA, 2010).

Avanços tecnológicos, como estratégias de clonagem (JACKSON et al, 1972) e mutagênese sítio dirigida (HUTCHISON et al, 1978), permitem a manipulação genética dos patógenos, e podem contribuir no desenho de vacinas de primeira, segunda e terceira gerações. Dessa forma, é possível obter mutantes atenuados ou conhecer genes envolvidos na patogenicidade e desenvolver vacinas cada vez mais eficazes e específicas.

### 1.9.2 Vacinas anti-HTLV-1

O desenvolvimento de vacinas tem proporcionado um grande impacto na saúde pública mundial. Entretanto, apesar da infecção pelo HTLV-1 ser endêmica em diferentes regiões geográficas do mundo, ainda permanece sem um método de profilaxia eficaz. A maioria das vacinas de DNA plasmidial, desenvolvidas até o momento, induziram resposta imune protetora em modelos utilizando animais de pequeno porte, porém a imunogenicidade destas em primatas mostrou-se menos potente (DONNELLY et al, 1997; MACGREGOR et al, 1998).

Estudos recentes sugerem uma nova abordagem, que otimiza elementos regulatórios no esqueleto do vetor vacinal, melhorando a imunogenicidade das vacinas de DNA. Entre diversas regiões analisadas, verificou-se que a adição de uma sequência reguladora da região R da região LTR do HTLV-1 à região promotora/reguladora do citomegalovírus (CMV) aumenta de 5 a 10 vezes a expressão dos transgenes *env* e *gag* do HIV-1, e intensifica a resposta imune celular contra antígenos. Foi demonstrado também que além da incorporação do elemento R do HTLV-1, a utilização dos transgenes separados, no lugar de genes codificando proteínas de fusão, representa uma estratégia simples e prática que contribui para o aperfeiçoamento das vacinas de DNA (BAROUCH et al, 2005). Estes dados demonstram que a otimização de elementos regulatórios específicos aumenta substancialmente a imunogenicidade das vacinas de DNA codificando antígenos diferentes em animais de pequeno porte e em primatas não humanos. Esta estratégia poderia, portanto, ser explorada como um método potencial para o desenvolvimento de uma vacina anti-HTLV-1.

Em outro estudo, realizado por um grupo de pesquisadores do Institut Pasteur da França e do Instituto Nacional do Câncer nos EUA, foi avaliada a imunogenicidade e eficácia de uma vacina de DNA, cujo vetor era derivado do vírus vaccinia (NYVAC) contendo o gene *env* ou *env* e *gag* do HTLV-1. Três macacos-esquilo foram vacinados, com o recombinante contendo apenas *env* (doses nos tempos 0, 1 e 3 meses) e submetidos à transfusão intravenosa de células infectadas com o HTLV-1. A resposta imune contra o HTLV-1 foi detectada em um único animal vacinado. No entanto, após uma dose única (inicial) com o recombinante contendo apenas *env*, seguido pela imunização com a vacina NYVAC HTLV-1 *gag* e *env*, aos 6, 7 e 8 meses, todos os três

animais se mostraram protegidos após transfusão com células infectadas pelo HTLV-1 (KAZANJI et al, 2001). Além disso, estudos avaliaram a eficácia de um vetor vacinal derivado do poxvírus (R-ALVAC), onde quatro coelhos brancos da Nova Zelândia foram vacinados com o vetor R-ALVAC nos meses 0 e 1. Após o desafio vacinal, 100% dos coelhos mostraram-se protegidos. Infelizmente, essa proteção não foi duradoura, visto que no mês 11 os animais se tornaram infectados (FRANCHINI et al, 1995).

O fato de indivíduos infectados sintomáticos normalmente apresentarem uma resposta imune mais ativada e a intenção de se criar uma vacina com antígenos mais imunogênicos capazes de aumentar a eficiência da resposta imune do indivíduo imunizado pode, num primeiro momento, parecer antagônico. Porém, a eficácia da resposta imune do hospedeiro diante da primo-exposição ao HTLV-1, precisa ser forte o suficiente para eliminar o vírus, bem como as células por ele infectadas, e deve acontecer numa velocidade maior que a propagação viral. Logo, o desenvolvimento de uma vacina profilática, que imunizará indivíduos saudáveis, poderá conter a infecção pelo HTLV-1.

## 2 JUSTIFICATIVA

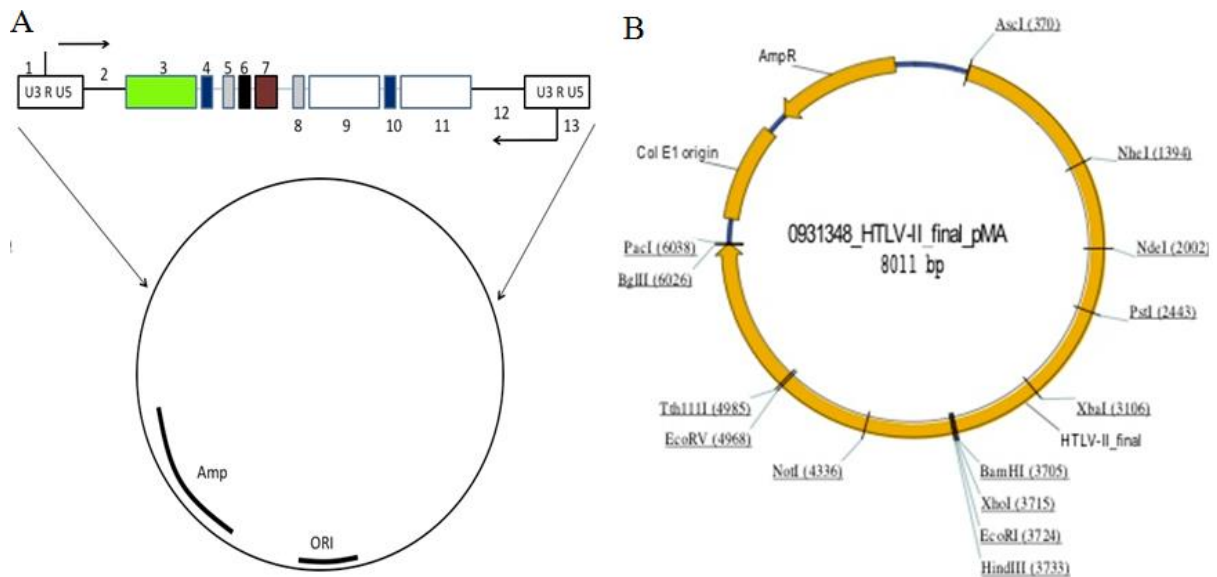
A infecção pelo HTLV-1 é endêmica em diferentes regiões geográficas do mundo, onde no Brasil, atinge aproximadamente, 2,5 milhões de pessoas (CARNEIRO-PROIETTI et al, 2002; CATALAN-SOARES et al, 2004). Embora estudos realizados estimem que a maioria dos portadores do HTLV-1 não apresenta manifestações clínicas da infecção, diversas patologias já foram associadas à infecção pelo HTLV-1, como mielopatia associada ao HTLV/ paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (ROMAN; OSAME, 1988), leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) (POIESZ et al, 1980), dermatite infectiva (LA GRENADE, 1996), artropatias (NISHIOKA, 1996), uveítes (MOCHIZUIKI et al, 1992), entre outras.

Os fatores que definem a manifestação de doenças relacionadas ao HTLV-1, bem como a persistência do quadro assintomático ainda não foram completamente esclarecidos. Além disso, até o momento não foi descrita nenhuma terapia específica eficaz na cura da infecção pelo HTLV-1. Dessa forma, faz-se necessário o investimento em estudos a cerca do desenvolvimento de uma vacina anti-HTLV-1, que possa atuar através de efeito profilático, principalmente em áreas endêmicas.

Diversos trabalhos vêm sendo realizados em busca de uma vacina anti-HTLV-1, e seus resultados demonstraram que uma vacina anti-HTLV-1 é plausível e merece um estudo mais aprofundado. Diante disso, pesquisadores de instituições brasileiras firmaram colaboração com o grupo de vacinas do Instituto Nacional do Câncer, do Instituto Nacional de Saúde do Governo dos EUA (*Vaccine Branch* -NCI/NIH), com o intuito de realizar testes acerca de uma vacina anti-HTLV-1.

A partir dessa colaboração, o pesquisador Dr. Luiz Carlos Junior Alcântara e a Dra Genoveffa Franchini desenvolveram um vetor vacinal anti-HTLV-1. Este vetor foi desenhado contendo as regiões 5'LTR e 3'LTR do HTLV-2, em que serão inseridos os genes *gag* e *env* do HTLV-1 sob o controle da extremidade 3'LTR do genoma viral.

O vetor vacinal construído caracteriza-se por ser policistrônico e possuir diversas regiões importantes para a expressão do vetor vacinal recombinante, conforme figura 14-A. O plasmídeo pMA foi utilizado como esqueleto para a inserção do vetor vacinal (Figura 14-B).



- 1) LTR 5' – HTLV-2
- 2) Sinal de empacotamento
- 3) Gene codificante para a proteína verde fluorescente GFP
- 4) Sítio de clonagem
- 5) Sinal de poliadenilação
- 6) Sequência FLAP
- 7) *Cis-acting*
- 8) Elemento de transporte constitutivo (CTE)
- 9) Sítio para o gene de interesse 1
- 10) Sequência IRES
- 11) Sítio para o gene de interesse 2
- 12) Sequência que protege o sítio 13 da metilação
- 13) LTR 3' – HTLV-2

Figura 14. Desenho esquemático do vetor. O vetor (A) foi inserido no esqueleto do plasmídeo pMA (B), totalizando 8011pb.

Estudos desenvolvidos com o intuito de avaliar se variações em regiões promotoras podem afetar a expressão gênica sugerem que pequenas alterações em *motifs* podem ter impacto direto na regulação da expressão dos genes. Estudos de mutagênese sítio dirigida realizados em animais demonstram que mutações na região E Box, por exemplo, podem aumentar ou diminuir a transcrição gênica, dependendo do tipo celular onde a mutação ocorreu (MEREZAK et al, 2001).

Portanto, para a utilização desse vetor recombinante faz-se necessário caracterizar a região promotora do HTLV-2, avaliando assinaturas nucleotídicas presentes em diferentes subtipos, bem como a presença de *motifs* importantes para a expressão do vetor vacinal.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Análise *in silico* da possível utilização do HTLV-2 atenuado contra a infecção pelo HTLV-1.

#### 3.2 Específicos

- Caracterizar a região LTR de pacientes mono-infectados com HTLV-2, provenientes do Centro Integrativo de HTLV e Hepatites Virais (CHTLV);
- Identificar possíveis assinaturas nucleotídicas presentes em sequências da região LTR do HTLV-2 depositadas no *GenBank*, e sequências provenientes de pacientes do CHTLV;
- Caracterizar e comparar, entre os diferentes subtipos do HTLV-2, os possíveis *motifs* presentes em sequências da região LTR depositadas no *GenBank*, e sequências provenientes de pacientes do CHTLV;
- Caracterizar a região promotora do vetor recombinante do HTLV-2;
- Preparar o gene *env* do HTLV-1, em sua versão total (gp63) e parcial (gp46), para posterior inserção no vetor recombinante do HTLV-2.



## 4 RESULTADOS

Os resultados obtidos sobre a caracterização molecular da região promotora do HTLV-2 foram resumidos e organizados em forma de *Sequence Note* intitulado “*MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HTLV-2 LONG TERMINAL REPEAT REGION: A DISCUSSION ABOUT POSSIBLE INFLUENCES AT VIRAL GENE EXPRESSION*”, e está descrito no Capítulo I. O referido artigo foi publicado na revista *AIDS Research and Human Retroviruses*.

Os resultados da caracterização da região promotora do vetor vacinal HTLV-2 foram organizados no Capítulo II. Os resultados referentes ao preparo do gene *env* do HTLV-1 para posterior inserção no vetor recombinante do HTLV-2 estão descritos no Capítulo III e IV.

## 4.1 Capítulo I

AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES  
Volume 29, Number 00, 2013  
© Mary Ann Liebert, Inc.  
DOI: 10.1089/aid.2013.0181

# Molecular Characterization of the Human T Cell Lymphotropic Virus Type 2 Long Terminal Repeat Region: A Discussion about Possible Influences at Viral Gene Expression

Fernanda K. Barreto<sup>1</sup>, Felipe F.A. Rego<sup>1</sup>, Loiana M. Fonseca<sup>1</sup>, Bernardo Galvão-Castro-Filho,<sup>2</sup>  
Thessika H.A. Araújo<sup>1</sup>, Aline Cristina A. Mota-Miranda,<sup>2,3</sup>  
Joana P. Monteiro-Cunha,<sup>2,3</sup> and Luiz Carlos J. Alcantara<sup>1</sup>

### Abstract

This study aimed to identify nucleotide signatures in the promoter region of human T cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) isolated from infected individuals from Salvador, Brazil and in sequences from the GenBank database. DNA samples from HTLV-2-infected individuals were submitted to nested polymerase chain reaction (PCR) and sequencing, and molecular analyses were performed using bioinformatics tools. The phylogeny of HTLV-2 strains isolated from patients from Salvador reveals that all sequences were subtype c. One hundred and fifty-one sequences from GenBank were selected, among which 30 belong to subtype a, 88 to subtype b, 32 to subtype c, and one to subtype d. Subtype-specific signatures were identified as well as mutations resulting in loss or gain of motifs important to transcription regulation. The subtypes a and b have two E box motifs, while subtypes c and d have only one. These polymorphisms may impact viral fitness and infection outcome and should be more closely investigated.

**H**UMAN T CELL LYMPHOTROPIC virus type 2 (HTLV-2) was described in 1982.<sup>1</sup> Currently this virus is found mainly among Brazilian Amerindians, African populations, and intravenous drug users (IVDU) from the United States, Europe, and Asia.<sup>2</sup> HTLV-2 is not clearly identified as the etiologic agent of human pathologies, although it seems to be linked to neurological disorders and appears to be associated with an increased incidence of autoimmune diseases and respiratory tract infections.<sup>3,4</sup>

Viral and host factors are probably involved in determining the infection outcome. It is believed that small variations in the HTLV-2 long terminal repeat (LTR) region may modify the binding ability of transcription factors and this could influence gene expression.

Although most of the HTLV-2 genome remains stable, considerable variations are noted in the promoter region of this retrovirus. Phylogenetic analysis, using this region and the *env* gene, demonstrated three main subtypes of HTLV-2: HTLV-2a, HTLV-2b,<sup>5</sup> and HTLV-2d.<sup>6</sup> In addition, one cluster

within subtype a, formed exclusively by viral isolates from Brazil, was described in 1996, and it is called HTLV-2c.<sup>7</sup> Despite this genetic variability, to date there are no reports describing nucleotide signatures specific to the viral subtypes or evaluating the consequences of nucleotide variations at the gene expression.

Therefore, this study was performed with the objective of identifying nucleotide variations (signatures) in the HTLV-2 promoter region of isolates from different geographic regions and from different viral subtypes.

Blood samples were collected from 15 infected individuals followed at the HTLV reference center of Bahia School of Medicine and Public Health, located in Salvador city, Northeastern Brazil. All patients were monoinfected with HTLV-2. The Ethnic Committee of Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ approved this study. Informed consent was obtained from all patients.

DNA was extracted using a spin column QIAamp DNA Blood Minikit (Qiagen) following the manufacturer's

<sup>1</sup>Laboratório Hematologia, Genética e Biologia Computacional, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil.

<sup>2</sup>Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brazil.

<sup>3</sup>Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Salvador, Bahia, Brazil.

protocol. Samples were submitted to a nested polymerase chain reaction (PCR) with outer primers BSQF6/BSDR3 and inner primers BSQF2/BSDR4, to amplify a 672-pb fragment from the HTLV-2 LTR region.<sup>8</sup> All amplified products were submitted to an electrophoresis assay, using a 1% agarose gel with Syber Safe DNA (Invitrogen).

The PCR products were purified using the PureLink PCR Purification Kit (Invitrogen) and sequenced using the ABI Prism 3100 DNA Sequencer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) with the Taq FS Dye terminator (Applied Biosystems) cycle sequencing. The same inner primers BSQF2/BSDR4 were used in the sequencing reactions and the electropherogram was analyzed with SeqScape software (Applied Biosystems SeqScape Software v.2.5). In parallel, we performed data mining for HTLV-2 LTR region sequences deposited in the GenBank database and selected 151 sequences, which were longer than 650 pb. These sequences are from different geographic regions and belong to different populations.

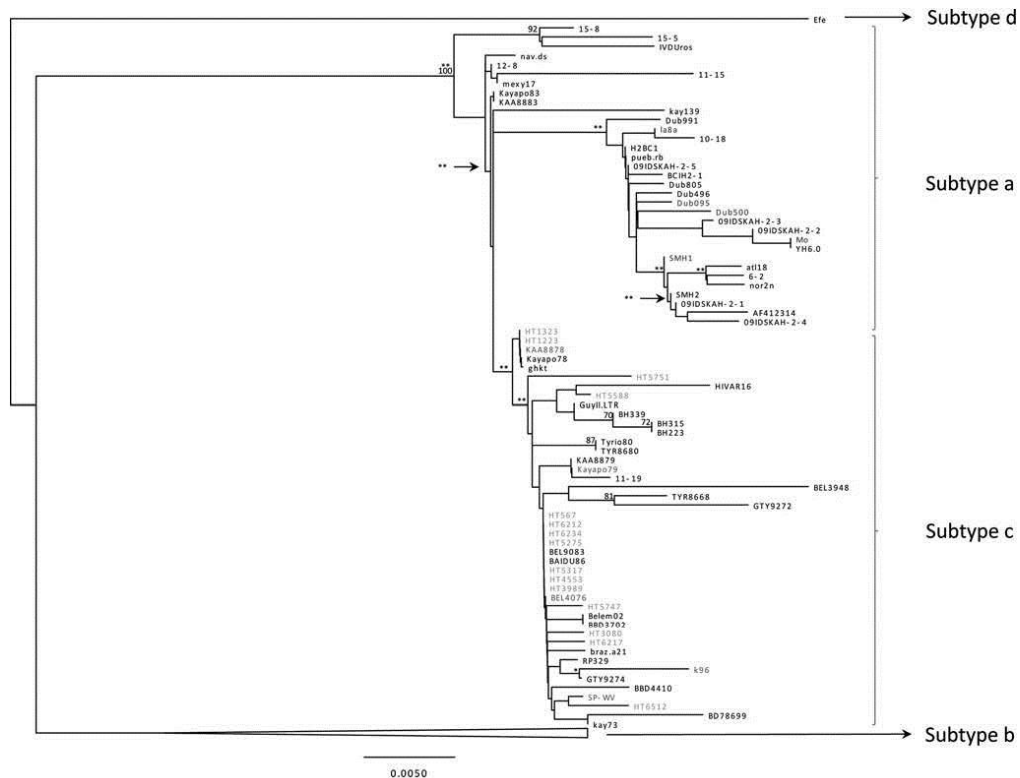
Clustal X software was used to perform the multiple sequence alignment with the new generated sequences and the sequences recruited from the GenBank database.<sup>9</sup> Finally, the multiple alignment was manually edited in the BioEdit program.<sup>10</sup>

Neighbor-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) trees were obtained with the PAUP 4.0 program using the HKY85 nucleotide substitution model.<sup>11</sup> The reliability of NJ trees was evaluated by analyzing 1,000 bootstrap replicates. The trees were visualized with the FigTree v.1.3.1 program.

The sequences were organized into groups with the same subtype, and, using the BioEdit program, a consensus sequence was created to each set of subtype sequences. The search for motifs and different molecular characteristics among the sequences from different subtypes was performed using the Geneious v.5.6.5 program.<sup>12</sup> The genetic distances were measured within and between the different subtypes using the MEGA 5.05 program.<sup>13</sup>

Currently the GenBank database provides 347 HTLV-2 LTR sequences. From this set of sequences, 151 were longer than 650 pb and, therefore, were included in the study. Phylogenetic analysis was performed using these 151 sequences and the new 15 HTLV-2 LTR sequences (672 pb) generated in this study.

Our analyses showed that 30 of the 151 sequences were subtype a, 88 sequences were subtype b, 32 were subtype c, and 1 was subtype d. All new generated HTLV-2 LTR sequences were subtype c (Fig. 1). The NJ phylogenetic analysis has ML support.



**FIG. 1.** Phylogenetic analysis of the long terminal repeat (LTR) region using a neighbor-joining (NJ) approach. The Efe strain was used as an outgroup. The new samples are shown in black and the sequences from GenBank are shown in gray. Statistical evaluation of branch lengths results is shown as \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$ .

## HTLV-2 LTR CHARACTERIZATION

3

TABLE 1. GENETIC DISTANCES IN DIFFERENT SUBTYPES OF HTLV-2 USING THE MEGA 5.05 PROGRAM

	Subtype a	Subtype b	Subtype c	Subtype d
Subtype a	0.009	0.049	0.014	0.072
Subtype b	0.049	0.008	0.047	0.052
Subtype c	0.014	0.047	0.007	0.072
Subtype d	0.072	0.052	0.072	#

(#) The subtype d corresponds to only one sequence and therefore it is not possible to calculate the genetic distance into this subtype.

The 166 sequences were submitted to molecular characterization through the comparative analysis of consensus sequences. It was possible to identify seven nucleotide variations, called signatures, in the subtype a isolates, among which four (14T, 116T, 117T, and 741T) were present in all 30 sequences. Twelve signatures were identified among the subtype b strains, and six of them (114A, 166A, 271A, 275G, 629T, and 661C) were present in 100% of the b sequences. Analyzing the subtype c sequences, we identified only one signature (401T), which was found in 43 sequences. It is important to note that some signatures of subtype a are also frequently found in subtype c. The genetic distances measure demonstrated that genetic distance between sequences from subtypes a and c was lower than the distance between the other subtypes, and the genetic distance between sequences from subtypes a and d was the same as the calculated distance between subtypes c and d (Table 1). This probably occurs because HTLV-2c is considered a subcluster of HTLV-2a, since it has a similar Tax protein to HTLV-2b and the *env* gene and an LTR region similar to the HTLV-2a subtype.<sup>6</sup>

Using the consensus sequences obtained from each set of specific subtype sequences, the search for transcription factors was performed. Some motifs for transcription factors described previously in eukaryotic cells were sought in these

TABLE 2. TRANSCRIPTION FACTOR MOTIF IDENTIFICATION AMONG THE SUBTYPE CONSENSUS SEQUENCE OF THE HUMAN CELL LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE 2 LONG TERMINAL REPEAT REGION

Transcription factor motif	Nucleotide position <sup>a</sup>	Subtype consensus sequences
CRE	98–102	a, b, c, d
SRE	109–118	b, c
ETS	119–122	a, b, c
CRE	138–142	a, b, c, d
ETS	156–159/162–165	a, b, c, d
Poly(A)	180–185	b, d
CRE	231–235	a, b, c, d
Poly(A)	269–274	a, b, c, d
ETS	275–278	b
TATA	287–292	a, b, c, d
ETS	361–364	a, b, c, d
E box	738–743	a, b
ETS	752–755	a, b, c, d
E box	762–767	a, b, c, d
ETS	780–783	a, b, c, d

<sup>a</sup>The nucleotide position was done using the reference sequence Mo (M10060).

sequences: TATA box, CAT box, CG box, E box, NF- $\kappa$ B, CRE, GATA box, ETS, SRE, SP1, poly(A), and CpG islands. It was not possible to identify many differences regarding the transcription factor binding sites appearance and frequency between the consensus sequences, and it was also not possible to identify all the above described transcription factor motifs in the consensus sequences (Table 2). The CpG islands are located at the same site (nucleotide position: 293) in all subtypes (Fig. 2). The nucleotide sites of all molecular analyses were identified using the reference sequence Mo (M10060).

Considering that the transcription factor motifs are important in regulating the transcription of HTLV-2 provirus, mutations associated with the loss or gain of any of these motifs could be responsible for changes in viral gene expression. Studies have shown that mutations in the E box region, for example, may increase or decrease transcription of viral genes, depending on the cell type in which the mutation occurred. Studies using the bovine leukemia virus (BLV) and performing site-directed mutagenesis assays suggest that mutations that result in the loss of the E box motif increase the expression of the LTR region and therefore these motif could be associated with transcription repression.<sup>14</sup>

In this study, we did not find geographic signatures or signatures among intravenous drug users compared with infected tribes and African populations. However, we have identified subtype-specific signatures, comparing the 15 new sequences and the 151 already published sequences. We have also demonstrated that the 15 new HTLV-2 isolates from Salvador belong to subtype c. Moreover, we have found mutations that result in loss or gain of the motifs important in regulating viral gene transcription. Therefore we believe that these results should be more closely investigated, because the regulation of gene transcription can influence the infection outcome.

## Sequence Data

The GenBank accession numbers for the sequences included in the phylogenetic analysis are as follows: Dub095 (AF032989), Dub500 (AF032990), nav.ds (U10257), 15-8 (U73015), 15-5 (U73020), IVDUros (AF054272), 12-8 (U73008), mexy17 (L42510), 11-15 (U73021), Dub805 (AF175467), Dub991 (AF032993), 10-18 (U73019), la8a (U10256), H2BC1 (AF115495), BCIIH2-1 (AF185282), pueb.rb (U10262), 09IDSKAH-2-5 (JN247462), Dub496 (AF032992), 09IDSKAH-2-4 (JN247461), 09IDSKAH-2-3 (JN247460), 09IDSKAH-2-2 (JN247459), YH6.0 (NC001488), SMH1 (Y09147), SMH2 (Y09148), 09IDSKAH-2-1 (JN247458), AF412314, atl18 (U10252), nor2n (U10258), 6-2 (U73022), Mo (M10060), Kayapo83 (AF139390), KAA8883 (AF306733), ghkt (L42507), kay139 (L42508), Tyrio80 (AF139391), TYR8680 (AF306730), Kayapo78 (AF139388), KAA8878 (AF306731), Kayapo79 (AF139389), 11-19 (U73013), KAA8879 (AF306732), k96 (AF326584), RP329 (AF326583), HIVAR16 (JN222964), GuyILLTR (AF262408), BH339 (AY509602), BH223 (AY509600), BH315 (AY509601), BEL9083 (AF306726), BAIDU86 (AF401492), BBD3702 (AF306735), Belem02 (AF139392), SP-WV (AF139382), TYR8668 (AF306729), GTY9272 (AF306727), GTY9274 (AF306728), BEL3948 (AF306724), braz.a21 (U10253), BBD4410 (AF306734), BEL4076 (AF306725), BD78699 (DQ235706), kay73 (L42509), Efe (Y14365), G2 (AF074965), G12 (L11456), wyu1 (HTU12792), BDAR6 (JN222947), 4-10 (HTU73016), 6-4 (HTU73018), 12-7 (HTU73012), pueb.ag (HTU10261), sem1051 (HTU10264),

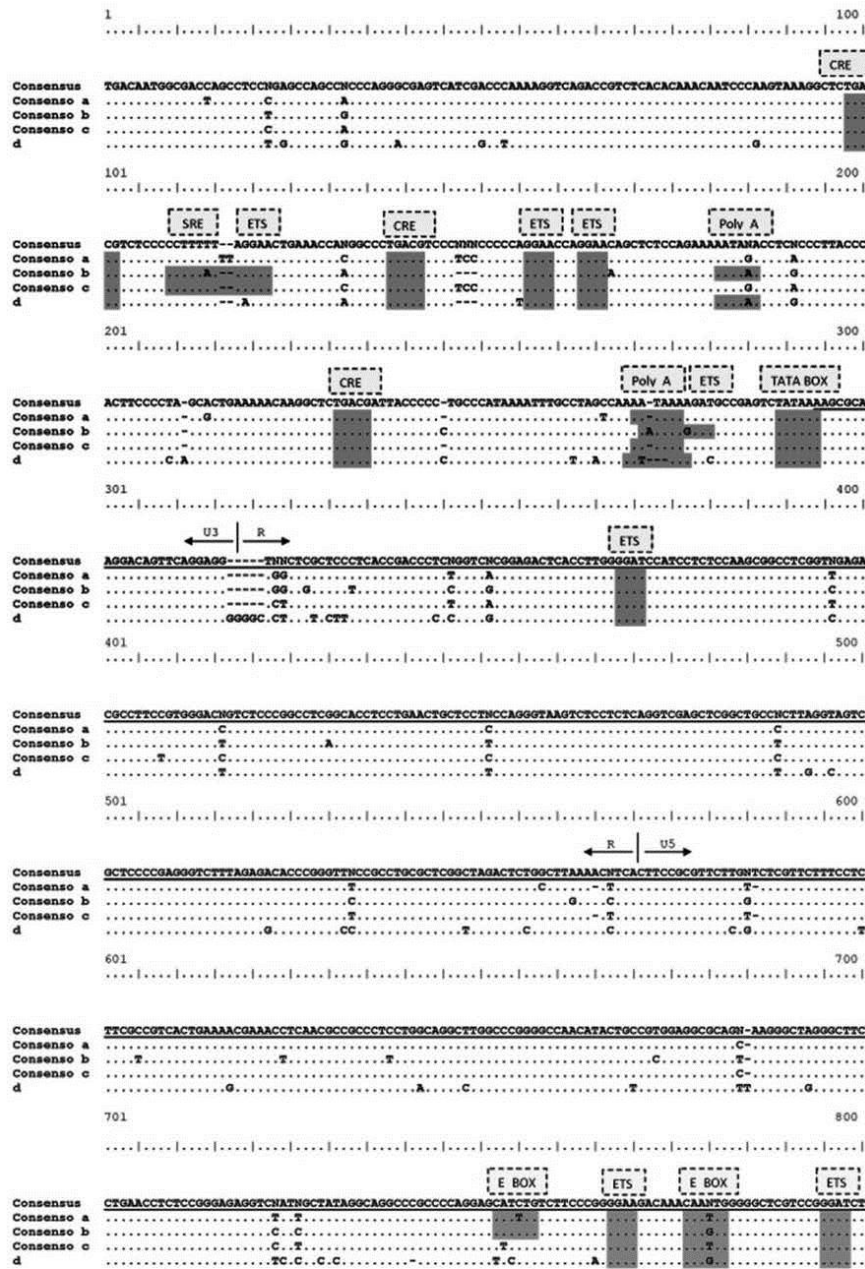


FIG. 2. Comparison of occurrence and frequency of transcription factor motifs in human T cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) LTR subtype consensus sequence. Some motifs that were sought were not found. The CpG Island is underlined.

## HTLV-2 LTR CHARACTERIZATION

5

Py136 (GQ330488), Py115 (GQ330493), 330110 (GU212849), 230102 (GU212848), penn7a (HTU10260), 2-4 (HTU73011), 15-21 (HTU73017), HIVAR4 (JN222952), HIVAR3 (JN222951), HIVAR12 (JN222960), HIVAR5 (JN222953), wyu2 (HTU12794), Py139 (GQ330490), HIVAR6 (JN222954), Py138 (GQ330489), Py141 (GQ330491), Py142 (GQ330492), Py1116 (GQ330494), Py1124 (GQ330496), PYGCAM-1 (Z46888), pilaga (AF054271), BDAR2 (JN222943), BDAR4 (JN222945), 14-17 (HTU73009), NRA-P (L20734), FOR6 (AF054273), Py1121 (GQ330495), HIVAR10 (JN222958), semi1050 (HTU10263), HTLV-II-Gab (Y13051), BDAR3 (JN222944), Gab1080FC (EU444100), 550602 (GU212854), 880701 (GU212850), 670802 (GU212851), 500101 (GU212852), 590101 (GU212853), ita47a (HTU10254), 324 (L77243), RVP (L77244), JÁ (L77239), DP (L77237), ny185 (HTU10259), 9-17 (HTU73014), JAN (L77241), JL (L77240), SP21 (AY442384), ita50a (HTU10255), I-AM (Y09149), I-OG (Y09154), I-IT (Y09151), I-OV (Y09155), SP17 (AY442380), SP12 (AY442375), SP23 (AY442386), SP22 (AY442385), SP20 (AY442383), SP6 (AY442369), SP8 (AY442371), span130 (HTU10266), BF (L77236), RC (L77235), AA (L77238), SP2 (AY442365), 130 (L77242), SP4 (AY442367), SP15 (AY442378), SP7 (AY442379), SP26 (AY442389), SP14 (AY442377), SP16 (AY442379), PortNn (AY622978), SP19 (AY442382), SP24 (AY442387), SP3 (AY442366), SP13 (AY442376), SP9 (AY442372), span129 (HTU10265), SP11 (AY442374).

The GenBank accession numbers of the new HTLV-2 LTR sequences included in the phylogenetic analysis are as follows: HT567 (KF146724), HT1223 (KF146716), HT1323 (KF146717), HT3080 (KF146718), HT3989 (KF146719), HT4553 (KF146720), HT5275 (KF146721), HT5317 (KF146722), HT5588 (KF146723), HT5747 (KF146725), HT5751 (KF146726), HT6212 (KF146727), HT6217 (KF146728), HT6234 (KF146729), HT6512 (KF146730).

## Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

## References

1. Kalyanaraman VS: A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 1982;218:571-573.
2. Vandamme AM: Evolutionary strategies of human T-cell lymphotropic virus type II. *Gene* 2000;261:171-180.

3. Araujo A: Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. *Ann Neurol* 2004;56:10-19.
4. Roucoux DF: The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev* 2004;6:144-154.
5. Hall WW: Multiple isolates and characteristics of human T-cell leukemia virus type II. *J Virol* 1992;66:2456-2463.
6. Vandamme AM: African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-2d subtype in Congolese Bambuti Efe pygmies. *J Virol* 1998;72:4327-4340.
7. Eiraku N: Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. *J Virol* 1996;70:1481-1492.
8. Alcantara LC: Brazilian HTLV type 2a strains from intravenous drug users (IDUs) appear to have originated from two sources: Brazilian Amerindians and European/North American IDUs. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2003;19:519-523.
9. Jeanmougin F: Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 1998;23:403-405.
10. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 1999;41:95-98.
11. Swofford DL: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). PAUP\* 2002, 1-142.
12. Geneious 6.1 created by Biomatters Ltd., 2013.
13. Tamura K: MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011;28:2731-2739.
14. Merezak C: Suboptimal enhancer sequences are required for efficient bovine leukemia virus propagation in vivo: Implications for viral latency. *J Virol* 2011;75:6977-6988.

Address correspondence to:

Luiz Carlos Junior Alcantara  
LHGB/CPqGM/FIOCRUZ  
Rua Waldemar Falcão 121  
Brotas, Salvador  
Bahia 40295-001  
Brazil

E-mail: lalcan@bahia.fiocruz.br

## 4.2 Capítulo II

A partir do estudo “*MOLECULAR CHARACTERIZATION OF HTLV-2 LONG TERMINAL REPEAT REGION: A DISCUSSION ABOUT POSSIBLE INFLUENCES AT VIRAL GENE EXPRESSION*” desenvolvido com o intuito de avaliar variações na região LTR do HTLV-2 foi possível caracterizar a região promotora do vetor vacinal HTLV-2, avaliando a presença de assinaturas nucleotídicas e *motifs* importantes para a expressão do vetor vacinal.

Para tal, inicialmente a sequência da região promotora do vetor vacinal foi alinhada com as sequências consenso HTLV-2a, HTLV-2b, HTLV-2c e a sequência única obtida no banco de dados *GenBank* classificada como HTLV-2d, com o auxílio do programa Clustal X. Em seguida, o alinhamento foi editado manualmente utilizando o programa Bioedit. As sequências alinhadas e editadas foram submetidas à subtipagem, utilizando o programa PAUP 4.0 (Figura 15). Conforme o esperado, a região LTR do vetor vacinal pertence ao subtipo HTLV-2a, visto que a sequência Mo (M10060) foi utilizada como parâmetro para o desenvolvimento do vetor.

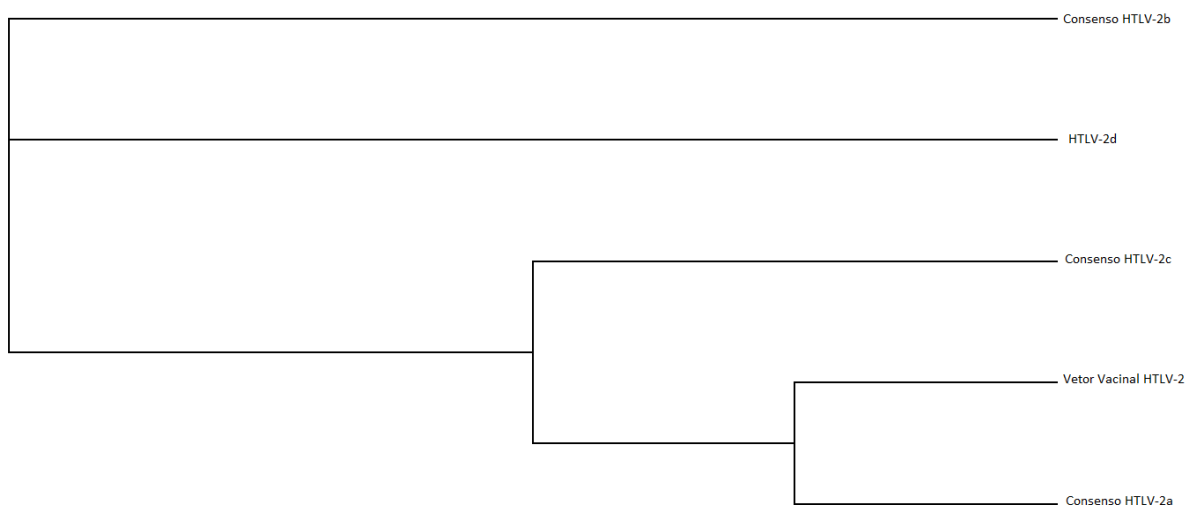


Figura 15. Análise Filogenética da região LTR do HTLV-2.

Em seguida, a caracterização molecular da região promotora do vetor vacinal foi realizada, com o auxílio do programa Bioedit. As sequências consenso utilizadas na subtipagem foram comparadas com a região promotora do vetor, e observou-se algumas alterações pontuais. Conforme a figura 16, apenas duas alterações resultam em perda de *motif*. Na posição 742, o vetor vacinal possui uma deleção, enquanto as sequências consenso HTLV-2a e HTLV-2b possuem um *motif* E Box. Da mesma forma, observa-se que a sequência do vetor vacinal possui uma Guanina (G) na posição 763, enquanto as sequências HTLV-2a, HTLV-2b, HTLV-2c e HTLV-2d possuem uma Adenina (A). Logo, o vetor vacinal HTLV-2 não possui o *motif* E Box (CANNTG).

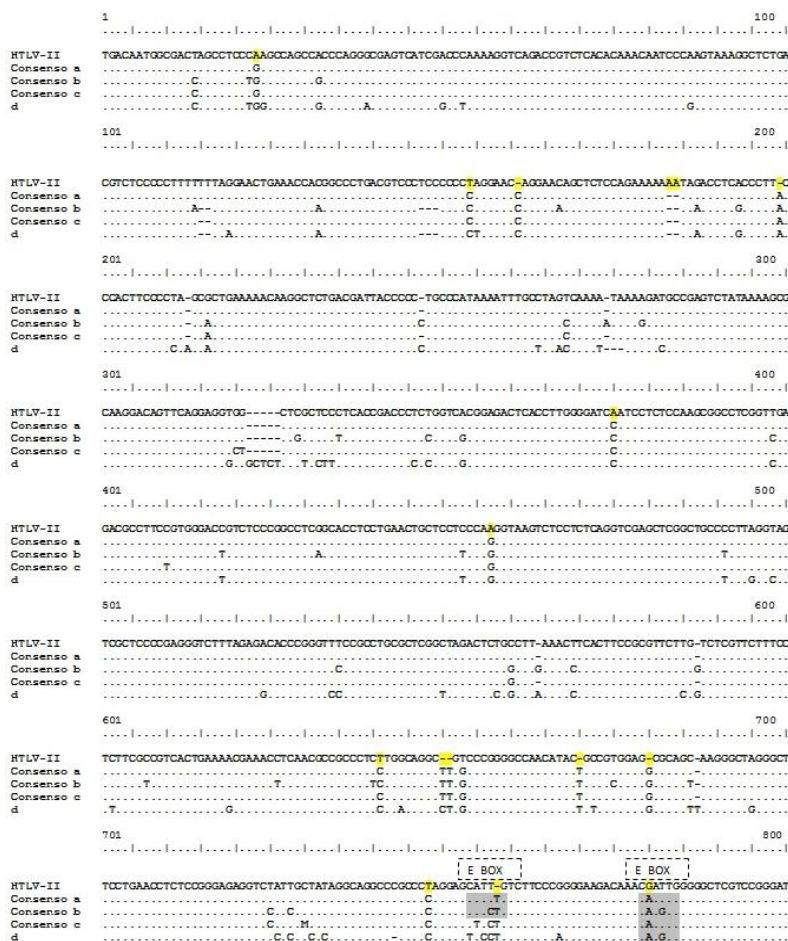


Figura 16- Análise molecular da região promotora do vetor vacinal HTLV-2. Comparação com sequências de diferentes subtipos do HTLV-2.



### 4.3 Capítulo III

Sabe-se que os indivíduos infectados pelo HTLV-1 desenvolvem uma resposta imune significativa contra os produtos proteicos do gene *env* do HTLV-1. Estudos demonstram inclusive que a região central da gp46 é responsável por 90% dos anticorpos anti-*env* que são produzidos nos indivíduos infectados (SHERMAN et al, 1993). Portanto, o gene *env*, em sua versão total (gp63) e parcial (gp46), foi selecionado para a preparação inicial do vetor vacinal recombinante do HTLV-2. Posteriormente, o gene *gag* também será utilizado.

Estudos de caracterização molecular da gp46 realizados em nosso laboratório identificaram cinco mutações presentes em mais de 20% das sequências analisadas (n=346). Utilizando ferramentas de bioinformática, observou-se que essas mutações resultaram em alteração do perfil-físico químico da gp46, inclusive sugerindo alterações na imunogenicidade da mesma (miranda et al, 2013) (Tabela 1). Logo, essas mutações poderão ser utilizadas na construção do vetor vacinal recombinante do HTLV-2.

Tabela 1: Mutações identificadas a partir da caracterização molecular da gp46.

<b>Mutação</b>	<b>Perfil Clínico</b>
F14S	HAM/TSP-Definido
S35L	Assintomático
N42H	HAM/TSP-Definido
G72S	HAM/TSP-Definido
V247I	HAM/TSP-Definido / Assintomático

Para a análise funcional dessas mutações inicialmente foram desenhados *primers*, utilizando o *software Clone Manager*, contendo as cinco mutações de interesse e utilizando o kit *Phusion High-Fidelity PCR Master Mix*, ensaios de mutagênese sítio dirigida foram realizados (Tabela 2). Para tal técnica, utilizamos o plasmídeo pBID, que recebemos como

doação da Dra. Thérèse Astier-Gin, Université Victor Ségalen Bordeaux. Esse plasmídeo possui a sequência completa da glicoproteína precursora da gp46, a gp63.

Tabela 2: Resumo dos *primers* utilizados para reação de mutagênese sítio dirigida. Em vermelho estão identificados os sítios responsáveis pela geração da troca de aminoácidos.

Nome	Alteração (nucleotídeo)	<i>Primer forward e reverse</i>
F14S	T41C	5' TTTATTCTTCCAGT <b>C</b> CTGCCCCCTCATCC 3' 3' AAATAAGAAGGTCAGGACGGGGGAGTAGG 5'
S35L	C104T	5' GGAGTCTCCT <b>T</b> ATACCACTCT 3' 3' CCTCAGAGGA <b>A</b> TATGGTGAGA 5'
N42H	A124C	5' CTCTGAACCCTGC <b>C</b> ATCCTGCCCAGCC 3' 3' GAGACTTGGGACGGTAGGACGGGTCGG 5'
G72S	G214A	5' GCCCTAATCTAGTA <b>A</b> GTTACTCTAGCTAC 3' 3'CGGGATTAGATCAT <b>T</b> CAATGAGATCGATG 5'

Após os ensaios de mutagênese sítio dirigida, células *Dh5a* competentes foram transformadas e os clones selecionados foram submetidos à minipreparação plasmidial, utilizando o kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega).

Os produtos da minipreparação plasmidial foram submetidos ao sequenciamento no sequenciador automático ABI3100 utilizando o kit Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram conduzidas com a utilização de *primers* desenhados exclusivamente para essa técnica, gerando fragmentos apenas *forward*, que permitem a confirmação da mutação de interesse. A avaliação da qualidade do sequenciamento, assim como a obtenção da sequência gerada foi realizada utilizando o programa SeqScape (Applied Biosystems SeqScape Software v 2.5).

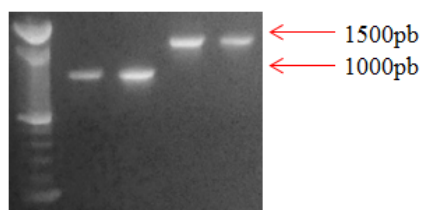
Utilizando o programa BioEdit (HALL, 1999), foram identificados e selecionados os clones que possuíam as mutações de interesse, conforme exemplificado na figura 17.



Tabela 3: Resumo dos *primers* utilizados para PCR. Em amarelo evidencia-se o sítio de restrição da enzima, e em azul a sequência KOZAK.

<b>Primers para a sequência completa do gene <i>env</i></b>	
<b>Nome</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>
gp46 F	GCATGCATGGGTAAGTTTCTCGCCACTTTG
gp21 R	GCATGCTTACAGGGATGACTCAGGG
gp46 F KOZAK	GCATGC GCCACC ATGGGTAAGTTTCTCGCCACTTTG
gp21 R KOZAK	GCATGC GGTGGC TTACAGGGATGACTCAGGG
<b>Primers para a sequência do gene <i>env</i> que codifica a <i>gp46</i></b>	
<b>Nome</b>	<b>Sequência (5' – 3')</b>
gp46 F	GCATGCATGGGTAAGTTTCTCGCCACTTTG
gp46 R	GCATGCGGCCAGGGCGGAGACAA
gp46 F KOZAK	GCATGC GCCACC ATGGGTAAGTTTCTCGCCACTTTG
gp46 R KOZAK	GCATGC GGTGGC GGCCAGGGCGGAGACAA

De posse dos *primers* realizamos a padronização da PCR, cujo resultado foi visualizado através da eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 18).



- Poço 1: marcador de peso molecular de 100pb;
- Poço 2: produto purificado da PCR - *primers* gp46 F e gp46 R;
- Poço 3: produto purificado da PCR - *primers* gp46 FKozak e gp46 RKozak;
- Poço 4: produto purificado da PCR - *primers* gp46 F e gp21R;
- Poço 5: produto purificado da PCR - *primers* gp46 FKozak e gp21 RKozak;

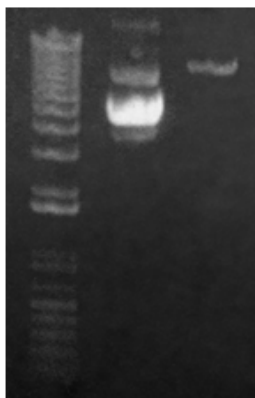
Figura 18. Gel de agarose 1% corado com Syber Safe, para demonstrar o sucesso da amplificação do gene *env*.

Em seguida, os produtos da PCR foram purificados utilizando kit de purificação Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Os produtos de PCR purificados foram submetidos ao sequenciamento no sequenciador automático ABI3100 utilizando o kit *Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). As reações de sequenciamento foram conduzidas com a utilização dos mesmos *primers* utilizados na PCR, gerando fragmentos *forward* e *reverse*. A avaliação da qualidade do sequenciamento, assim como a obtenção da sequência consenso gerada a partir dos fragmentos *forward* e *reverse*, foram realizadas utilizando o programa SeqScape (Applied Biosystems SeqScape Software v 2.5) (Figura 19).



Figura 19 – Eletroferograma ilustrativo do sequenciamento do produto da PCR realizada com os *primers* gp46F e gp46R.

Para a construção do vetor recombinante contendo o gene *env* em sua versão parcial ou total, o vetor recombinante do HTLV-2 foi clivado com a endonuclease de restrição SphI, que reconhece um único sítio na posição 4.634 do vetor HTLV-2, considerando a posição 1 o primeiro nucleotídeo da região 5'LTR. O resultado foi observado através da eletroforese em gel de agarose 0,6% (Figura 20).



Poço 1: marcador de peso molecular de 1kb;  
Poço 2: vetor HTLV-2;  
Poço 3: vetor HTLV-2 após digestão com SphI;

Figura 20 - Gel de agarose 0,6% corado com Syber Safe, para demonstrar o sucesso na digestão do vetor HTLV-2.

## 5 PERSPECTIVAS

### 5.1 Ensaio Funcionais (gp46)

A análise funcional da gp46 será realizada com os clones obtidos nesse trabalho, conforme capítulo III. Os clones contendo as mutações serão transfectados em células de linhagem 293-TN, utilizando o reagente de transfecção Effectene (Qiagen). Após 48 horas da transfecção, as células 293-TN serão lisadas utilizando o tampão para lise celular, contendo inibidor de protease. Em seguida, será dosada a concentração protéica à 595nm, por espectrofotometria, utilizando o reagente Bradford. A SDS-PAGE será realizada com 10ug de proteína, em gel de poliacrilamida tris/glicina.

Após a SDS-PAGE, as proteínas serão transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando o aparelho Blot Dry Blotting System (Invitrogen). As membranas serão bloqueadas com 5% de leite em PBS-TWEEN20 por 1 hora à temperatura ambiente, e em seguida serão lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos. A revelação será feita em filme de RX, que posteriormente será digitalizado para quantificação por densitometria. A tubulina será utilizada com controle para a reação.

A partir dos resultados obtidos com os ensaios funcionais da gp46 será possível determinar se as mutações descritas (F14S, S35L, N42H, G72S e V247I) poderão ser utilizadas na construção do vetor vacinal recombinante do HTLV-2.

### 5.2 Construção do vetor vacinal HTLV-2

Para a construção do vetor recombinante contendo o gene *env*, o vetor será clivado com a endonuclease de restrição específica e o inserto será clivado com a mesma enzima, já que o seu sítio de restrição foi incluído nas extremidades dos *primers* utilizados para PCR. Para a construção do vetor recombinante *env-gag*, a digestão dos amplicons e vetor

(HTLV-2-env) será realizada utilizando a enzima de restrição XbaI, que reconhece um sítio único na posição 3.106 do vetor HTLV-2. Posteriormente, o vetor será defosforilado utilizando a enzima TSAP.

Os fragmentos clivados serão inseridos no vetor clivado e defosforilado, utilizando a enzima T4 DNA ligase. Os vetores serão então submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,6%. Em seguida, células Dh5 $\alpha$  competentes serão transformadas e os clones selecionados serão submetidos à minipreparação plasmidial, utilizando o kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega). Os produtos da minipreparação plasmidial serão submetidos ao sequenciamento e utilizando o programa BioEdit serão selecionados os clones que possuem o fragmento inserido na orientação correta no vetor. Estes clones serão submetidos à maxipreparação plasmidial, utilizando o kit NucleoBond Xtra Maxi (Prodinol).

Os vetores recombinantes contendo os transgenes serão transfectados em células de linhagem 293-TN e HeLa, além de células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis, utilizando o reagente de Transfecção Effectene (Qiagen).

Após 48 horas da transfecção, as células 293-TN serão lisadas utilizando o tampão para lise celular, contendo inibidor de protease. Em seguida, será dosada a concentração protéica à 595nm, por espectrofotometria, utilizando o reagente Bradford. A SDS-PAGE será realizada com 10 $\mu$ g de proteína, em gel de poliacrilamida tris/glicina. Após a SDS-PAGE, as proteínas serão transferidas para a membrana de nitrocelulose utilizando o aparelho Blot Dry Blotting System (Invitrogen). As membranas serão bloqueadas com 5% de leite em PBS-TWEEN20 por 1 hora à temperatura ambiente, e em seguida serão lavadas e incubadas com os respectivos anticorpos. A revelação será feita em filme de RX, que posteriormente será digitalizado para quantificação por densitometria. A tubulina será utilizada com controle para a reação.

A imunofluorescência será realizada após 48hs da transfecção, onde as células HeLa serão fixadas em uma lamínula utilizando para-formaldeído, e tratadas com os respectivos anticorpos primários por 1 hora. Os anticorpos serão marcados com Alexaflúor (Invitrogen). Em seguida, utilizaremos o marcador de núcleo celular DAPI, e as lâminas serão armazenadas por 16 horas à 40C. A visualização da marcação das proteínas expressas será realizada na Plataforma de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, em microscópio óptico de fluorescência Olympus BX 51.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A partir desse trabalho foi possível realizar a caracterização molecular da região promotora de diferentes subtipos do HTLV-2, em sequências disponíveis no banco de dados *GenBank* e em sequências provenientes de provenientes do Centro Integrativo de HTLV e Hepatites Virais (CHTLV).
- A análise molecular da região LTR de sequências provenientes de pacientes do CHTLV demonstrou que todos os pacientes incluídos nesse estudo possuem o subtipo c do HTLV-2.
- A identificação de *motifs* presentes em diferentes subtipos do HTLV-2 revelou pequenas diferenças, que merecem ser alvos de estudos mais aprofundados, como ensaios funcionais que possam esclarecer quais as consequências *in vitro* dessas variações.
- A análise *in silico* da eficiência da transcrição gênica dos diferentes subtipos do HTLV-2 e da sequência promotora do vetor recombinante do HTLV-2 revelou diferenças quanto à presença de *motifs* importantes para a regulação da expressão.
- O vetor recombinante HTLV-2 não possui o *motif* E Box, e conforme Merezak e colaboradores (2001), o *motif* E Box seria responsável pela repressão da transcrição.
- Portanto, o vetor recombinante do HTLV-2 pode ser utilizado como vetor vacinal anti-HTLV-1 em ensaios pré-clínicos que avaliarão a expressão proteica de genes de interesse inseridos na posição 9 e 11 do vetor, sob o comando da região LTR 3' do HTLV-2.
- Para os ensaios pré-clínicos iniciais do vetor recombinante do HTLV-2, selecionamos o gene *env* em suas versões parcial e total. Nesse trabalho foi possível realizar a preparação desses genes, bem como a preparação de genes mutantes da gp46 para posterior avaliação funcional.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, T. H. A. **Desenvolvimento de um banco de dados (HTLV-1 molecular epidemiology database) para datamining e data management de sequências do HTLV-1**. 2012. Dissertação. Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa. Salvador.

BANGHAM, C. R. M. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. **Journal of General Virology**. v. 84. n. 12. p. 3177-3189. 2003.

BARBEAU, B., et al. Making Sense out of Antisense Transcription in Human T-Cell Lymphotropic Viruses (HTLVs). **Viruses**. v. 3. n. 12. p. 456-468. 2011.

BAROUCH, D. H., et al. A Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Regulatory Element Enhances the Immunogenicity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Vaccines in Mice and Nonhuman Primates. **Journal of Virology**. v. 79. n. 14. p. 8828-8834. 2005.

BARRETO, M. L., et al. BCG vaccine: efficacy and indications for vaccination and revaccination. **Jornal de Pediatria**. v. 82. n. 7. p. 45-54. 2006.

BERCHE, P. Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 18. n. 5. p. 1-6. 2012.

BINDHU, M., et al. Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T cell activation, and cellular gene expression. **Front Biosci**. v. 9. n. p. 2556-2576. 2004.

BITTENCOURT, A. L., et al. Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma in Bahia, Brazil: Analysis of Prognostic Factors in a Group of 70 Patients. **American Journal of Clinical Pathology**. v. 128. n. 5. p. 875-882. 2007.

BRITES, C., et al. HIV/human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. **AIDS Rev**. v. 11. n. 1. p. 8-16. 2009.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B., et al. [Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 35. n. 5. p. 499-508. 2002.

CATALAN-SOARES, B., et al. Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV. Vírus-T linfotrópico humano em familiares de candidatos a doação de sangue soropositivos: disseminação silenciosa. **Rev Panam Salud Publica**. v. 16. n. 6. p. 387-394. 2004.

CATALAN-SOARES, B., et al. 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. **Cad Saude Publica**. v. 21. n. 3. p. 926-931. 2005.

CHEN, J., et al. HTLV type I isolated from a Pygmy in Cameroon is related to but distinct from the known central African type. **AIDS Res Hum Retroviruses**. v. 11. n. 12. p. 1529-1531. 1995.

CIMARELLI, A., et al. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type II in patients with high proviral load. **Virology**. v. 223. n. 2. p. 362-364. 1996.

CONSTATINE, N. T., et al. **Retroviral Testing. Essential for Quality Control and Laboratory Diagnosis**. CRC Press. 1992.

COURGNAUD, V., et al. Simian T-Cell Leukemia Virus (STLV) Infection in Wild Primate Populations in Cameroon: Evidence for Dual STLV Type 1 and Type 3 Infection in Agile Mangabeys (*Cercocebus agilis*). **Journal of Virology**. v. 78. n. 9. p. 4700-4709. 2004.

DE THE, G., et al. An HTLV-I/II vaccine: from animal models to clinical trials? **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**. v. 13 Suppl 1. n. p. S191-198. 1996.

DELAMARRE, L., et al. The HTLV-I envelope glycoproteins: structure and functions. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**. v. 13 Suppl 1. n. p. S85-91. 1996.

DINIZ, M. d. O., et al. Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. **Estudos Avançados**. v. 24. n. 70. p. 2010.

DONNELLY, J. J., et al. DNA vaccines. **Annu Rev Immunol**. v. 15. n. p. 617-648. 1997.

DOURADO, I., et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr**. v. 34. n. 5. p. 527-531. 2003.

EIRAKU, N., et al. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. **J Virol**. v. 70. n. 3. p. 1481-1492. 1996.

EPHRUSSI, A., et al. B lineage--specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. **Science**. v. 227. n. 4683. p. 134-140. 1985.

FENNER, F., et al. **Smallpox and its eradication**. Geneva: World Health Organization. 1988.

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 Res Hum Retroviruses**. v. 11. n. 2. p. 307-313. 1995.

FURUKAWA, Y., et al. Different cytokine production in tax-expressing cells between patients with human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis and asymptomatic HTLV-I carriers. **J Infect Dis.** v. 187. n. 7. p. 1116-1125. 2003.

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. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet.** v. 2. n. 8452. p. 407-410. 1985.

GESSAIN, A., et al. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Frontiers in Microbiology.** v. 3. n. p. 2012.

GESSAIN, A., et al. Geographic and molecular epidemiology of primate T lymphotropic retroviruses: HTLV-I, HTLV-II, STLV-I, STLV-PP, and PTLV-L. **Adv Virus Res.** v. 47. n. p. 377-426. 1996.

GESSIAN, A., et al. Highly divergent molecular variants of human T-lymphotropic virus type I from isolated populations in Papua New Guinea and the Solomon Islands. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 88. n. 17. p. 7694-7698. 1991.

GHEZ, D., et al. Neuropilin-1 Is Involved in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Entry. **Journal of Virology.** v. 80. n. 14. p. 6844-6854. 2006.

GONÇALVES, D. U., et al. Dermatologic lesions in asymptomatic blood donors seropositive for human T cell lymphotropic virus type-1. **Am J Trop Med Hyg.** v. 68. n. 5. p. 562-565. 2003.

GORDON, S. N., et al. Preexisting Infection with Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 2 neither Exacerbates nor Attenuates Simian Immunodeficiency Virus SIVmac251 Infection in Macaques. **Journal of Virology.** v. 84. n. 6. p. 3043-3058. 2010.

GREEN, P. L., et al. **Fields Virology.** 4 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2001.

HAHN, B. H., et al. Molecular cloning and analysis of a new variant of human T-cell leukemia virus (HTLV-ib) from an African patient with adult T-cell leukemia-lymphoma. **Int J Cancer.** v. 34. n. 5. p. 613-618. 1984.

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.

HALL, W. W., et al. Multiple isolates and characteristics of human T-cell leukemia virus type II. **J Virol.** v. 66. n. 4. p. 2456-2463. 1992.

- HANCHARD, B., et al. **Human Retrovirology: HTLV**. New York: Raven Press. 1990.
- HANON, E., et al. Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I. **Immunity**. v. 13. n. 5. p. 657-664. 2000.
- HINUMA, Y., et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 78. n. 10. p. 6476-6480. 1981.
- HOSHINO, H. Cellular Factors Involved in HTLV-1 Entry and Pathogenicity. **Frontiers in Microbiology**. v. 3. n. p. 2012.
- HUTCHISON, C. A., 3rd, et al. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. **J Biol Chem**. v. 253. n. 18. p. 6551-6560. 1978.
- JACKSON, D. A., et al. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 69. n. 10. p. 2904-2909. 1972.
- JOHNSON, J. M., et al. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). **Int J Exp Pathol**. v. 82. n. 3. p. 135-147. 2001.
- JONES, K. S., et al. Molecular Aspects of HTLV-1 Entry: Functional Domains of the HTLV-1 Surface Subunit (SU) and Their Relationships to the Entry Receptors. **Viruses**. v. 3. n. 12. p. 794-810. 2011.
- KALYANARAMAN, V. S., et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**. v. 218. n. 4572. p. 571-573. 1982.
- KAPLAN, J. E., et al. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. **J Acquir Immune Defic Syndr**. v. 3. n. 11. p. 1096-1101. 1990.
- KAZANJI, M., et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 NYVAC and naked DNA vaccine candidates in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **J Virol**. v. 75. n. 13. p. 5939-5948. 2001.
- KNIGHT, S. C., et al. Dendritic cells in HIV-1 and HTLV-1 infection. **Adv Exp Med Biol**. v. 329. n. p. 545-549. 1993.
- KOYANAGI, Y., et al. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. **Virology**. v. 196. n. 1. p. 25-33. 1993.

LA GRENADE, L. HTLV-I-associated infective dermatitis: past, present, and future. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** v. 13 Suppl 1. n. p. S46-49. 1996.

LAL, R. B., et al. Sensitivity and specificity of a recombinant transmembrane glycoprotein (rgp21)-spiked western immunoblot for serological confirmation of human T-cell lymphotropic virus type I and type II infections. **J Clin Microbiol.** v. 30. n. 2. p. 296-299. 1992.

LEVIN, M. C., et al. Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. **Nature Medicine.** v. 8. n. 5. p. 509-513. 2002.

MACGREGOR, R. R., et al. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. **J Infect Dis.** v. 178. n. 1. p. 92-100. 1998.

MAHIEUX, R., et al. Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in Pygmies. **J Virol.** v. 71. n. 2. p. 1317-1333. 1997.

MANEL, N. Human T Cell Leukemia Virus Envelope Binding and Virus Entry Are Mediated by Distinct Domains of the Glucose Transporter GLUT1. **Journal of Biological Chemistry.** v. 280. n. 32. p. 29025-29029. 2005.

MANEL, N., et al. HTLV envelopes and their receptor GLUT1, the ubiquitous glucose transporter: a new vision on HTLV infection? **Front Biosci.** v. 9. n. p. 3218-3241. 2004.

MATSOUKA, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology.** v. 2. n. 1. p. 27. 2005.

MATSOUKA, M., et al. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. **Retrovirology.** v. 6. n. 1. p. 71. 2009.

MATSUOKA, M., et al. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature Reviews Cancer.** v. 7. n. 4. p. 270-280. 2007.

McCALLUM, R. M., et al. Arthritis syndromes associated with human T cell lymphotropic virus type I infection. **Med Clin North Am.** v. 81. n. 1. p. 261-276. 1997.

MEREZAK, C., et al. Suboptimal Enhancer Sequences Are Required for Efficient Bovine Leukemia Virus Propagation In Vivo: Implications for Viral Latency. **Journal of Virology.** v. 75. n. 15. p. 6977-6988. 2001.

MESNARD, J. M., et al. HBZ, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia. **Blood.** v. 108. n. 13. p. 3979-3982. 2006.

MIURA, T., et al. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 91. n. 3. p. 1124-1127. 1994.

MOCHIZUIKI, M., et al. Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical, and virologic studies. **J Infect Dis.** v. 166. n. 4. p. 943-944. 1992.

Mueller, N., et al. Findings from the Miyazaki Cohort Study. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** v. 13 Suppl 1. n. p. S2-7. 1996.

NAKAMURA, S., et al. Detection of tumor necrosis factor-alpha-positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. **J Neuroimmunol.** v. 42. n. 2. p. 127-130. 1993.

NATH, M. D. Regulation of the cell-surface expression of an HTLV-I binding protein in human T cells during immune activation. **Blood.** v. 101. n. 8. p. 3085-3092. 2002.

NEJMEDDINE, M., et al. The HTLV-1 Virological Synapse. **Viruses.** v. 2. n. 7. p. 1427-1447. 2010.

NISHIMURA, M., et al. Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor receptors type 1 and 2, lymphotoxin-alpha, and HLA-DRB1 gene polymorphisms in human T-cell lymphotropic virus type I associated myelopathy. **Hum Immunol.** v. 61. n. 12. p. 1262-1269. 2000.

NISHIOKA, K. HTLV-I arthropathy and Sjogren syndrome. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** v. 13 Suppl 1. n. p. S57-62. 1996.

OSAME, M. Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). **J Neurovirol.** v. 8. n. 5. 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. 2009.

PINON, J. D., et al. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Envelope Glycoprotein gp46 Interacts with Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. **Journal of Virology.** v. 77. n. 18. p. 9922-9930. 2003.

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. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 77. n. 12. p. 7415-7419. 1980.

PRESTON, B. D., et al. Mechanisms of retroviral mutation. **Trends Microbiol.** v. 4. n. 1. p. 16-21. 1996.

PROIETTI, A. B. F. C. **Cadernos Hemominas**. 4 ed. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais. 2006.

RENDE, F., et al. Comparison of the Genetic Organization, Expression Strategies and Oncogenic Potential of HTLV-1 and HTLV-2. **Leukemia Research and Treatment**. v. 2012. n. p. 1-14. 2012.

ROMAN, G. C., et al. Identity of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. **Lancet**. v. 1. n. 8586. p. 651. 1988.

ROUCOUX, D. F., et al. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. **AIDS Rev**. v. 6. n. 3. p. 144-154. 2004.

SALEMI, M. **Molecular investigations of the origin and genetic stability of the human T-cell lymphotropic viruses**. 1999. PHD. Katholieke Universiteit Leuven. Rega Instituut.

SALEMI, M., et al. Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closest relatives among African HTLV-I strains. **Virology**. v. 246. n. 2. p. 277-287. 1998.

SANTOS, F. L. N., et al. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. **J Bras Patol Med Lab**. v. 41. n. 2. p. 105-116. 2005.

SEIKI, M., et al. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 80. n. 12. p. 3618-3622. 1983.

SETOYAMA, M., et al. Detection of HTLV-1 by polymerase chain reaction in situ hybridization in adult T-cell leukemia/lymphoma. **Am J Pathol**. v. 152. n. 3. p. 683-689. 1998.

SHERMAN, M. P., et al. Sequence analysis of an immunogenic and neutralizing domain of the human T-cell lymphoma/leukemia virus type I gp46 surface membrane protein among various primate T-cell lymphoma/leukemia virus isolates including those from a patient with both HTLV-I-associated myelopathy and adult T-cell leukemia. **Cancer Res**. v. 53. n. 24. p. 6067-6073. 1993.

SHIMOYAMA, M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). **Br J Haematol**. v. 79. n. 3. p. 428-437. 1991.

SMITH, K. A. Edward Jenner and the Small Pox Vaccine. **Frontiers in Immunology**. v. 2. n. p. 2011.

SMITH, M. R., et al. Characterization of a novel nuclear localization signal in the HTLV-I tax transactivator protein. **Virology**. v. 187. n. 1. p. 316-320. 1992.



TERME, J.-M., et al. E box motifs as mediators of proviral latency of human retroviruses. **Retrovirology**. v. 6. n. 1. p. 81. 2009.

TSCHACHLER, E., et al. Human T-lymphotropic virus type I tax regulates the expression of the human lymphotoxin gene. **Blood**. v. 81. n. 1. p. 95-100. 1993.

VAN PROOYEN, N., et al. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 107. n. 48. p. 20738-20743. 2010.

VANDAMME, A. M., et al. Evolutionary strategies of human T-cell lymphotropic virus type II. **Gene**. v. 261. n. 1. p. 171-180. 2000.

VANDAMME, A. M., et al. Primate T-lymphotropic virus type I LTR sequence variation and its phylogenetic analysis: compatibility with an African origin of PTLV-I. **Virology**. v. 202. n. 1. p. 212-223. 1994.

VANDAMME, A. M., et al. African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-2d subtype in Congolese Bambuti Efe Pygmies. **J Virol**. v. 72. n. 5. p. 4327-4340. 1998.

VERDONCK, K., et al. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 7. n. 4. p. 266-281. 2007.

WATTEL, E., et al. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. **J Virol**. v. 69. n. 5. p. 2863-2868. 1995.

WOLFE, N. D., et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 102. n. 22. p. 7994-7999. 2005.

XIE, L., et al. Envelope Is a Major Viral Determinant of the Distinct In Vitro Cellular Transformation Tropism of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. **Journal of Virology**. v. 79. n. 23. p. 14536-14545. 2005.

YAMAGUCHI, K. Human T-lymphotropic virus type I in Japan. **Lancet**. v. 343. n. 8891. p. 213-216. 1994.

YASUNAGA, J., et al. Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms. **Cancer Control**. v. 14. n. 2. p. 133-140. 2007.

YOSHIDA, M., et al. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 79. n. 6. p. 2031-2035. 1982.

YOUNIS, I., et al. The human T-cell leukemia virus Rex protein. **Front Biosci.** v. 10. n. p. 431-445. 2005.