



**FIOCRUZ**

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

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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DAS PROTEÍNAS PAXILINA E  
MIOSINA-VA NA INFECTIVIDADE DO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE  
CÉLULAS T HUMANAS DO TIPO 1 (HTLV-1)**

**JAQUELINE GOES DE JESUS**

**Salvador - Brasil**

**2014**

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

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

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DAS PROTEÍNAS PAXILINA E  
MIOSINA-VA NA INFECTIVIDADE DO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE  
CÉLULAS T HUMANAS DO TIPO 1 (HTLV-1)**

**JAQUELINE GOES DE JESUS**

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara

Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup> Maria Fernanda de Castro-Amarante

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

**Salvador - Brasil**

2014

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

J599i Jesus, Jaqueline Goes de  
Estudo da participação das proteínas Paxilina e Miosina-va na infectividade do  
Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do tipo 1 (HTLV-1) / Jaqueline Goes  
de Jesus. - 2014.  
145 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara, Laboratório de  
Hematologia Genética e Biologia Computacional.

Dissertação (Mestrado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) –  
Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

1. HTLV-1. 2. Proteína Tax. 3. Miosina. 4. Paxilina. I.Título.

CDU 616.98:577.112

"INTERAÇÃO ENTRE OS PRODUTOS DAS ORFs I E IV DO HTLV – I COM MOTOR CELULAR Miosina  
– Va E A PROTEÍNA ADAPTADORA PAXILINA RESPECTIVAMENTE"

JAQUELINE GOES DE JESUS

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dra. Sandra Rocha Gadêlha  
Professora Adjunta  
UESC



---

Dra. Paula Carvalho Lage von Büettner Ristow  
Professora Adjunta  
UFBA



---

Dra. Dalila Luciola Zanette  
Pesquisadora  
CPqGM/FIOCRUZ

**FONTES DE FINANCIAMENTO**

CAPES

FAPESB

Dedico este trabalho aos meus pais **Edna** e  
**Jurandi** e ao meu irmão **Jônatas** por todo  
amor, dedicação e suporte nesta caminhada.

*Ó profundidade das riquezas, tanto da sabedoria, como da ciência de Deus! Quão insondáveis são os seus juízos, e quão inescrutáveis os seus caminhos! [...] Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; Glória, pois, a Ele eternamente.*

*Romanos 11: 33; 36*

## AGRADECIMENTOS

A *Deus*, primeiramente, pelo fôlego da vida!

Aos meus pais *Edna* e *Jurandi* por tudo o que são, pelo amor incondicional, pelo suporte e pela dedicação incontestável.

Ao meu irmão *Jônatas*, pelo amor, paciência, mas principalmente pela lealdade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara, pelas oportunidades concedidas e pela confiança, incentivo e contribuição para o meu desenvolvimento científico e profissional.

À minha co-orientadora, Dra. Maria Fernanda Castro Amarante, pelas deliciosas discussões e pelas contribuições valiosas, mesmo à distância.

À Dra. Simone Kashima Haddad pelo acolhimento e receptividade sem reservas, não apenas no Laboratório de Biologia Molecular da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDEHRP-USP), mas também em sua casa. Também pelas contribuições científicas, por ter sugerido o estudo que deu início a este trabalho; e principalmente pela amizade.

Aos amigos queridos da *Biomol*, Alexander Ferreira, Aline Romagnoli, Aline Ferreira, Daiane dos Santos, Fernanda Ursoli, Katia Otaguiri, Mariana Tomazini, Mayra Dorigan, Talitha Cuter e Tathiane Malta por terem me acolhido tão bem e por terem sido minha família, durante os meses em que estive em Ribeirão.



Especialmente ao Maurício Cristiano Rocha Junior (Maums), por todo o cuidado, e também à Evandra Sandoval Strazza (Eva) por me acompanharem desde o princípio e pelos ensinamentos silenciosos, que refletem o excelente modo de fazer ciência!

Ao búlgaro, Esvetoslav Nanov Slavov, pelo companheirismo, sinceridade e pelas caminhadas maravilhosas.

À Suelen Salustiano pela amizade, pelo encantamento pela dança e pelas boas risadas.

À Virgínia Mara Wagatsuma também pela amizade, pelas nossas conversas, saídas e principalmente pelo inesquecível Vapiano!

Aos amigos da transferência gênica, principalmente Ricardo Bonfim, pelas sugestões.

À Danielle Magalhães e Joseane Serrano, pela amizade, e pela ajuda na realização dos ensaios de imunocitoquímica e microscopia confocal.

À Carmen Simão por todo suporte administrativo e à Patrícia Bonini e Camila Menezes pela cortesia e acessibilidade na realização dos ensaios de citometria de fluxo.

À Dr. Maria Enilza Espreafico, pela calorosa receptividade no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer (FMRP-USP), por ter permitido minha permanência e realização de grande parte de deste trabalho em seu laboratório,

pela dedicação, e principalmente pela paixão e entusiasmo quando se trata de ciência, mas principalmente de Miosina.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Câncer (FMRP), em especial à Mariani Milanezi, pelo carinho e suporte emocional e à Carmen Lucia Pontes pela ajuda nos experimentos.

À Roberta Cosales pelo apoio na utilização do Laboratório Multiusuário Microscopia Confocal.

Especialmente, indescritivelmente e insuficientemente a *Rui Milton Patrício da Silva Junior*, por ter sido antes de tudo meu amigo e irmão. Agradeço por todo suporte, pelo acompanhamento, pelo direcionamento, pelos finais de semana ininterruptos no Multifótons, pelas madrugadas de experimento no laboratório, pelos protocolos e discussões, mas também pelos almoços e caminhadas, principalmente pelo companheirismo e dedicação, enfim, por tudo; sem você eu não teria conseguido.

À Silmara Reis Banzi pela maravilhosa amizade, palavras não seriam suficientes para expressar minha gratidão por tudo. Você é incrível e tem um lugar especial em minhas recordações.

Aos amigos do LHGB, em especial a Sanzio, Magda e Thassila, pelo incentivo e encorajamento. À Bruna de Sousa Carvalho Reis pelo suporte e ajuda em parte deste trabalho.

Às colaboradoras D. Eugênia, Jurema Carillo, Rita Santana, Jane Monteiro, D. Leda e D. Nice pelo apoio e prestatividade.

À Dra Lourdes Farrè e Everton pela disponibilização do laboratório LAPEX para realização de parte deste trabalho

Também, especialmente à minha grande amiga *Sara Nunes Vaz*, pela companhia sempre presente, pela dedicação, preocupação e suporte, pelas conversas e risadas, obrigada!

Especialmente à *Caroline da Guarda*, por ser um anjo! Amiga dedicada e paciente; agradeço pelo apoio mesmo à distância, pela companhia de sempre, pela revisão, pelos ajustes, pelos momentos de se estressar e principalmente pelos de desestressar.

Aos amigos Regina Nascimento, Maíra Silva, Candace Andrade, Tayane Fernandes, Afrânio Evangelista, Marcus Lima, Igor Ives e Caroline da Guarda (de novo) pela família que construímos, pela amizade verdadeira, pelos encontros, pelas discussões científicas ou não dos ORDINÁRIOS et al., pelas sugestões e pelos finais de semana sempre muito produtivos.

Aos mais que amigos da IB Sotero, mas especialmente à Camila Cruz, por ser a peça que encaixa, por nem a distância nem o tempo ter nos separados, por ter me acompanhado em todo o tempo que passei fora. Por ter ido comigo para Riberão sem sequer sair de casa. Pelas madrugadas em claro. Pela insistência, pelo suporte espiritual, pelo amor e pelo amor de novo; essas palavras não expressam nem a milésima parte da minha gratidão: muito obrigada!

A Raoni Freitas Carvalho por ter me impulsionado (cobrado) a concluir essa etapa, pelo incentivo e pela amizade sincera ao nível máximo, pela companhia e pela preocupação.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, e ainda que não citados, tiveram papel importantíssimo na realização deste trabalho: meu sincero agradecimento.

JESUS, Jaqueline Goes de. Estudo da participação das proteínas Paxilina e Miosina-Va na infectividade do Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do Tipo 1 (HTLV-1). 113 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## RESUMO

As ORFs I e IV do genoma do HTLV-1 codificam, respectivamente, as proteínas p12/p8 (acessória) e Tax (regulatória). p12/p8, de 99 aminoácidos, pode ser clivada em sua extremidade amino terminal gerando a proteína p8. A primeira clivagem proteolítica de p12 remove o sinal de retenção ao RE, enquanto a segunda clivagem, gera o produto de 8kDa, referido como p8. p12 localiza-se no sistema de endomembranes, residindo em RE e aparato de Golgi, enquanto p8 dirige-se para a membrana plasmática, onde é recrutada para a sinapse imunológica, através da ligação com o receptor de células T (TCR), além de participar da sinapse virológica e da formação de conduítes. A proteína Tax, por outro lado, atua como transativador transcricional do HTLV-1, sendo referida também na indução da expressão de diversos genes celulares, aumentando a proliferação e a migração das células infectadas. Na via de transporte de vesículas secretórias, vesículas produzidas como pós-Golgi são transportadas ao longo do citoesqueleto por motores celulares. A Miosina-Va, um motor não convencional, transporta diversos cargos, incluindo vesículas secretórias, vesículas sinápticas e de retículo endoplasmático. Outra proteína relacionada ao citoesqueleto é a Paxilina, que atua como molécula adaptadora nas adesões focais e cuja expressão está aumentada em indivíduos TSP-HAM. Na tentativa de compreender se Tax influencia no aumento da expressão de Paxilina e, paralelamente, se p8 trafega a partir de Golgi em direção à membrana, de maneira dependente de Miosina-Va, células de linhagem foram transfectadas, com o plasmídeo que expressa Tax ou com plasmídeos que expressam variantes da proteína p12

(pMEp12) fusionada a um tag de HA (hemaglutinina de influenza) e que expressam porções da Miosina-Va, incluindo a cauda completa neuronal conjugada com GFP (MyoVa FTNeu-eGFP), que funciona como dominante negativo e compete com a Miosina-Va constitutiva pelos seus ligantes intracelulares. A localização intracelular das proteínas foi realizada por ensaio de imunofluorescência indireta utilizando anticorpos contra a Paxilina ou contra o tag de HA e a cauda medial da Miosina-Va. Técnicas de microscopia confocal e obtenção de imagens foram realizadas utilizando o microscópio Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss Optical, Chester, Va.) e o software Adobe Photoshop CC. Surpreendentemente, nas células que expressavam Tax, a expressão de Paxilina, avaliada por imunofluorescência, foi menor, necessitando de novos ensaios para confirmação dos resultados. Em relação à p12/p8, foi observada a sua sub-localização celular como já descrito na literatura, apresentando-se na região perinuclear (RE e aparato de Golgi), e co-localização entre p12/p8 e Miosina-Va, embora apenas quando o dominante negativo MyoVa FTNeu-eGFP foi expresso simultaneamente com as variantes de p12, a localização de p12/p8 mostrou-se alterada, de pontos dispersos por todo o citoplasma e superfície celular para apresentar-se em forma de grumos agregados independentemente da variante de p12 expressa, sugerindo que a Miosina-Va desempenha um importante papel no tráfego de p8 partindo de Golgi até a superfície celular.

**Palavras-chave:** HTLV-1; Proteínas acessórias; Proteínas regulatórias; Tax, Paxilina; p12; p8; Miosina-Va.

JESUS, Jaqueline Goes de. Study of participation of Paxillin and Myosin-Va proteins in Human T cell lymphotropic virus type 1 infectivity. 113 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## **ABSTRACT**

HTLV-1 ORFs I and IV encode respectively p12/p8 (accessory protein) and Tax (regulatory protein). The 99 amino acid p12 protein can be proteolytically cleaved at the amino terminus to generate the p8 protein. The first proteolytic cleavage removes the ER retention/retrieval signal at the amino terminus of p12, while the second cleavage generates the p8 protein. The p12 protein localizes to cellular endomembranes, within the ER and Golgi apparatus, while p8 traffics to lipid rafts at the cell surface and is recruited to the immunological synapse upon T-cell receptor (TCR) ligation, virological synapse and conduits. Tax on the other hand acts as viral transactivator and induces expression of many cellular genes, increasing proliferation and migration of infected cells. In secretory vesicle transport, vesicles produced as post-Golgi are moved along the cytoskeleton by motor proteins. The unconventional myosin motor, Myosin-Va, moves several cargoes including secretory vesicles, synaptic vesicles, and the endoplasmic reticulum. Another cytoskeleton associated protein is Paxillin, an adapter on focal adhesions which expression is increased in TSP-HAM patients. To understand if Tax play a role on increased expression of Paxillin and parallel if p8 traffics from Golgi apparatus to cell surface on a myosin-Va dependent manner, lineage cells were transfected with Tax plasmids or pMEp12 plasmids which express variants (p12WT, p12 $\Delta$ 29 and p12G29S) of the fusion protein of HTLV-1 p12 tagged with the influenza hemagglutinin (HA1) tag and with the Myo-Va plasmids including full-tail neuronal-eGFP conjugated (MyoVa FTNeu-eGFP) plasmid which expresses a negative dominant of myosin Va and competes for intracellular ligands with cellular putative myosin. Proteins intracellular localization were analyzed by indirect

immunofluorescence assay using antibodies against Paxillin or the HA-tag and the Myo-Va protein. Confocal microscopy and image collection was performed by using a Zeiss LSM 780 microscope (Carl Zeiss Optical, Chester, Va.) with Adobe Photoshop CC software. Surprisingly in Tax-expressing cells Paxillin fluorescence was decreased requiring another assay to confirm this find. It was reported that p12 expression in Jurkat T, as previous described, was shown in perinuclear region which might be RE and Golgi apparatus and that p12/p8 and MyoVa proteins colocalizes in lineage cells, however only when MyoVa FTNeu-eGFP was simultaneously expressed with pMEp12 plasmids, p12/p8 localization showed to be altered from dots dispersed all over cytoplasm and cell surface to form cytoplasmic aggregates independently on variant of p12 expressed, suggesting that myosin Va plays an important role on traffics of p8 from Golgi to cell surface.

**Keywords:** HTLV-1; Accessory proteins; Regulatory proteins; Tax; Paxillin; p12; p8; Myosin Va.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Origem e disseminação do HTLV-1 baseada em análises filogenéticas e antropológicas -----	29
<b>Figura 2</b>	Distribuição geográfica dos subtipos A-G e formas principais de disseminação do HTLV-1 -----	31
<b>Figura 3</b>	Estrutura morfológica do HTLV-1 -----	33
<b>Figura 4</b>	Organização genômica do HTLV-1 -----	34
<b>Figura 5</b>	Região <i>pX</i> no genoma do HTLV-1 -----	34
<b>Figura 6</b>	Representação esquemática do genoma do HTLV-1: mRNAs e processamento -----	36
<b>Figura 7</b>	Ciclo básico de multiplicação de um retrovírus -----	39
<b>Figura 8</b>	Sinapse Viroológica -----	41
<b>Figura 9</b>	Mecanismos de disseminação do HTLV-1 -----	42
<b>Figura 10</b>	Formação dos conduítes celulares -----	43
<b>Figura 11</b>	Distribuição Geográfica do HTLV-1: países endêmicos -----	44
<b>Figura 12</b>	Desenho esquemático da estrutura primária das proteínas p12/p8 -----	46
<b>Figura 13</b>	Expressão de p12 por <i>Western Blot</i> -----	47
<b>Figura 14</b>	Sequência de aminoácidos de p12/p8 -----	48
<b>Figura 15</b>	Esquema das funções atribuídas a p12/p8 -----	50
<b>Figura 16</b>	Sinapse imunológica e ativação de células T -----	52
<b>Figura 17</b>	Esquema proteico da adesão focal -----	55

<b>Figura 18</b>	Domínios e interações da Paxilina -----	57
<b>Figura 19</b>	Resultado da quantificação da expressão do gene pxn por PCR quantitativa -----	58
<b>Figura 20</b>	Miosina V-----	60
<b>Figura 21</b>	Mapa da construção pcTax -----	64
<b>Figura 22</b>	Mapa da construção 18x21-EGFP -----	64
<b>Figura 23</b>	Desenho experimental para o teste de eficiência da transfecção por Lipofectamine 2000-----	66
<b>Figura 24</b>	Desenho experimental para verificação da influência de Tax sobre a expressão de Paxilina -----	68
<b>Figura 25</b>	Desenho experimental para localização de p12/p8 e co-localização com Miosina-Va -----	73
<b>Figura 26</b>	Padrão de expressão da proteína p12/p8 por WB-----	74
<b>Figura 27</b>	Expressão de GFP pós-transfecção por microscopia de fluorescência -----	81
<b>Figura 28</b>	Expressão de GFP por citometria de fluxo pós-transfecção em células HeLa-----	82
<b>Figura 29</b>	Expressão de GFP por citometria de fluxo pós-transfecção em células HEK-293T -----	82
<b>Figura 30</b>	Percentual de expressão de GFP e intensidade de fluorescência por citometria de fluxo -----	83
<b>Figura 31</b>	Expressão de Paxilina por Imunofluorescência-----	84
<b>Figura 32</b>	Expressão de Paxilina por Western Blot-----	85
<b>Figura 33</b>	Imunofluorescência da construção pME (vetor vazio) – controle	

Negativo -----	86
<b>Figura 34</b> Imunofluorescência da construção pME-p12_WT (sequencia selvagem) -----	87
<b>Figura 35</b> Imunofluorescência da construção pME-p12_G29S -----	88
<b>Figura 36</b> Imunofluorescência da construção pME-p12_Δ29-----	89
<b>Figura 37</b> Localização celular da cauda medial da Miosina-Va -----	91
<b>Figura 38</b> Expressão de p12p8 e cauda medial da Miosina-Va -----	92
<b>Figura 39</b> Imunofluorescência para p12p8 e cauda medial da Miosina-Va-----	93
<b>Figura 40</b> p12p8 e cauda medial da Miosina-Va colocalizam em agregados próximos à membrana -----	94
<b>Figura 41</b> Agregados citoplasmáticos de p8 e Miosina-Va-----	95
<b>Figura 42</b> Antígeno HA e α-CM MyoVa co-localizam na membrana de linfócitos T (Jurkat) 1-----	97
<b>Figura 43</b> Antígeno HA e α-CM MyoVa co-localizam na membrana de linfócitos T (Jurkat) 2 -----	98
<b>Figura 44</b> p8 e cauda medial da Miosina-Va co-localizam em forma de agregados espessos na região perimembranar de linfócitos T (Jurkat)-----	99
<b>Figura 45</b> p12 e cauda medial da Miosina-Va co-localizam em pontos dispersos no citoplasma de linfócitos T (Jurkat)-----	100
<b>Figura 46</b> Formação de agregados proteicos de p12/p8 em células co-transfectadas com o dominante negativo da Miosina-Va (MyoVaFTNeu-eGFP). --	102
<b>Figura 47</b> Formação de agregados proteicos de p12/p8 em células co-transfectadas com o dominante negativo da Miosina-Va (MyoVaFTNeu-eGFP). --	103

**Figura 48** Formação de agregados proteicos de em células co-transfectadas com o dominante negativo da Miosina-Va (MyoVaFTNeu-eGFP).----- 104

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Descrição das construções plasmídeais que expressam a proteína

p12/p8-----75

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**APC** – Célula Apresentadora de Antígenos

**ATLL** – Leucemia/Linfoma de Células T do adulto

**CRM-1** – *Chromosome region maintenance 1*

**DAPI** - 4',6-diamidino-2-fenilindol, marcador de DNA.

**DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

**FAK** – Quinase de Adesão Focal

**GFP** – Proteína Verde Fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)

**GLUT-1** – Transportador de Glicose de Classe 1

**HAM** – Mielopatia associada ao HTLV

**HEK** – Linhagem celular de rim de embrião humano (*Human Embryonic Kidney*)

**HELA** – Linhagem celular de carcinoma cervical obtido a partir da paciente Henrietta Lacks

**HSPG** – Proteoglicanos Heparan-Sulfato

**HTLV** – 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

**IL2-R** – Receptor de Interleucina 2

**kD** – Kilodaltons

**LAT** - Ligante para Ativação de Células T

**LTR** – Repetições Terminais Longas

**MHC** – Complexo Principal de Histocompatibilidade

**mRNA** – Ácido Ribonucleico mensageiro

**MTOC** – Centro de Organização Microtubular

**NCI** – *National Cancer Institute*

**NFAT** – Fator Nuclear de Ativação de Células T

**NIH** – *National Institutes of Health*

**NK** – Células *Natural Killers*

**ORF** – *Open Reading Frames*; Quadros Abertos de Leitura

**PBMCs** – Células Mononucleares de Sangue Periférico

**PBS** – Tampão salina-fosfato (*Phosphate buffered saline*)

**PTLV** – Vírus Linfotrópicos de células T de Primatas

**RBD** – Domínio de Ligação ao Receptor (*Receptor Binding Domain*)

**RE** – Retículo Endoplasmático

**SBF** – Soro Bovino Fetal

**SI** – Sinapse Imunológica

**STAT5** – Sinalizador de Transdução e Ativador da Transcrição 5

**STLV** – Vírus Linfotrópico de Células T de Símios

**TCR** – Receptor de Células T

**TR** – Transcriptase Reversa

**TSP** – Paraparesia Espástica Tropical

**UDIs** – Usuários de Drogas Intravenosas

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>26</b>
1.1	VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS	26
1.1.1	<i>Origem</i>	27
1.1.2	<i>Classificação</i>	30
1.1.3	<i>Estrutura morfológica e organização genômica</i>	32
1.1.4	<i>Ciclo de multiplicação viral</i>	38
1.1.5	<i>Transmissão viral e disseminação</i>	40
1.1.6	<i>Epidemiologia da infecção pelo HTLV-1</i>	43
1.2	OS PRODUTOS DA ORF-I	45
1.3	INTERAÇÃO COM PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO	54
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>61</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>62</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	62
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	62
<b>4</b>	<b>MEDOTOLOGIA</b>	<b>63</b>
4.1	INFLUÊNCIA DE TAX NA EXPRESSÃO DE PAXILINA	63
4.1.1	<i>Descrição das construções plasmídeais pcTax e 18x21-EGFP</i>	63
4.1.2	<i>Desenho Experimental</i>	65
4.1.3	<i>Cultura de células</i>	69
4.1.4	<i>Transfecção de DNA</i>	69
4.1.5	<i>Citometria de Fluxo</i>	70



4.1.6	<i>Imunocitoquímica para proteína Paxilina</i>	70
4.1.7	<i>Microscopia Confocal</i>	71
4.1.8	<i>Western Blot</i>	72
4.2	LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA p12/p8	73
4.2.1	<i>Desenho experimental</i>	73
4.2.2	<i>Descrição das construções plasmídeais</i>	74
4.2.3	<i>Cultura de células</i>	76
4.2.4	<i>Transfecção de DNA</i>	76
4.2.5	<i>Imunocitoquímica para proteína p12/p8</i>	76
4.2.6	<i>Microscopia Confocal</i>	77
4.3	CO-LOCALIZAÇÃO DE P12/P8 COM A PORÇÃO “CAUDA MEDIAL” DA Miosina-Va	78
4.4	CO-TRANSFECÇÃO COM DOMINANTE NEGATIVO DA Miosina-Va (MyoVaFTNeu-eGFP)	78
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>80</b>
5.1	CAPÍTULO I: INFLUÊNCIA DE TAX NA EXPRESSÃO DE PAXILINA	80
5.1.1	<i>Teste de Eficiência das construções plasmídeais</i>	80
5.1.2	<i>Verificação da influência de Tax sobre a expressão de Paxilina</i>	83
5.2	CAPÍTULO II: INTERAÇÃO ENTRE p12/p8 E MOSINA-Va	85
5.2.1	<i>Localização Celular da Proteína p12/p8</i>	85
5.2.2	<i>Co-localização de p12/p8 e Cauda Medial da Miosina-Va</i>	90
5.2.3	<i>Co-transfecção com Dominante Negativo da Miosina-Va (MyoVa</i>	

<i>FTNeu-eGFP)</i> -----	101
<b>6 DISCUSSÃO</b> -----	<b>106</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> -----	<b>115</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES</b> -----	<b>116</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> -----	<b>117</b>
<b>ANEXO A</b> -----	<b>130</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS

O Vírus Linfotrópico de Células T-Humanas Tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus humano descrito, sendo inicialmente associado à leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) no Japão (UCHIYAMA et al., 1977; POIESZ et al., 1980). Seu isolamento, no entanto, ocorreu apenas em 1980 a partir de um paciente com linfoma cutâneo de células T (POIESZ et al., 1980). Posteriormente, este vírus foi associado à paraparesia espástica tropical (TSP) (GESSAIN et al., 1985; RODGERS-JOHNSON et al., 1985) e à mielopatia associada ao HTLV (HAM) (OSAME et al., 1986), que por se tratar da mesma patologia, atualmente, é conhecida por TSP/HAM (ROMAN; OSAME, 1988). O HTLV é capaz de estabelecer uma infecção persistente em humanos e é o único retrovírus a apresentar propriedades oncogênicas nesta espécie (POIESZ et al., 1980). Além da ATLL e da TSP/HAM, o HTLV-1 está etiologicamente associado a diversas manifestações inflamatórias que incluem artropatias, polimiosite, uveíte, dermatite infecciosa, ceratoconjuntivite seca, Síndrome de Sjögren etc. (MORGAN et al., 1989; LA GRENADE, 1996; MERLE et al., 1996; MOCHIZUKI et al., 1996; NISHIOKA et al., 1996; WATANABE et al., 1997).

Em 1982, foi isolado o Vírus Linfotrópico de Células T Tipo 2 (HTLV-2), a partir de células imortalizadas de pacientes com leucemia de células pilosas

(KALYANARAMAN et al., 1982), no entanto a associação com esta patologia não foi posteriormente confirmada (CATALAN-SOARES et al., 2001). O HTLV-2 é sabidamente antigo, tendo estado presente em populações de índios americanos, e tendo sido introduzido em áreas urbanas das Américas, Europa e Ásia, através de usuários de drogas intravenosas (UDIs) (HALL et al., 1994). O tipo 2 do HTLV está associado a uma patologia semelhante, porém não tão severa quanto à TSP/HAM, além de predispor os portadores à infecções bacterianas devido ao imunocomprometimento (MURPHY et al., 1999). O tipo 2, assim como o tipo 1, tem capacidade de transformação celular *in vitro* (CHEN et al., 1983).

Recentemente, foram identificados os tipos 3 (HTLV-3) e 4 (HTLV-4) do HTLV em amostras de sangue de indivíduos na África Central, porém nenhuma associação deles com doenças em populações humanas foi descrita (CALATTINI et al., 2005; WOLFE et al., 2005).

### 1.1.1 Origem

Apesar da infecção pelo HTLV estar presente em todo o mundo, a África é o único continente em que todos os Vírus Linfotrópicos de Células T de Primatas (PTLV) foram encontrados. Estudos baseados em filogenética apontam, especificamente, a região da África Central, como o ponto de origem para o ancestral comum dos PTLVs (VAN DOOREN et al., 1998; VANDAMME et al., 1998; VERDONCK et al., 2007).

Devido à homologia entre as sequências gênicas do HTLV e do Vírus Linfotrópico de Células T de Símios (STLV) – que pertence à mesma família do HTLV – estudos sugerem que o HTLV tenha emergido do contato entre humanos e primatas não humanos infectados pelo STLV. Os tipos 1 e 2 do HTLV estão relacionados, respectivamente, aos STLV-1 e STLV-2, sugerindo que a origem destes vírus humanos ocorreu a partir dos vírus símios correspondentes. Sugere-se também, que a origem do tipo 3 se deu mais recentemente, a partir do STLV-3; em relação ao HTLV-4, no entanto, não foi encontrado equivalente do STLV que corresponda à sua origem até o momento. Além disso, o tipo 4 apresenta distinção filogenética em relação aos outros HTLVs conhecidos (WOLFE et al., 2005).

Apesar de não haver consenso sobre a origem geográfica do HTLV, a hipótese mais aceita é que a infecção por este retrovírus tenha se originado na África, sendo introduzida aos países do Novo Mundo (Caribe, Estados Unidos e América do Sul) por negros africanos, durante o período de tráfico de escravos e ao Japão pela tripulação africana dos navios portugueses durante os séculos XVI e XVII (Figura 1) (GALLO et al., 1983; GESSAIN et al., 1992; SAKSENA et al., 1992; SONG et al., 1995; CATALAN-SOARES et al., 2001). Estudos demonstraram ainda, que a introdução do HTLV no Brasil também se deu a partir de movimentos migratórios oriundos do continente africano, por meio do tráfico negreiro, ocorrido entre os séculos XVI e XIX; e mais recentemente, a partir do século XIX, através da intensa migração japonesa para o país, principalmente, para o estado de São Paulo (GALVÃO-CASTRO et al., 2009). Estudos corroboram o dado de que a Bahia é o estado brasileiro que recebeu o maior contingente de africanos durante

o tráfico negreiro, em sua maioria de Benin e Nigéria, oeste da África (VERGER, 1968; VIANA-FILHO, 1988;). A população de Salvador, capital baiana, é constituída, em cerca de 80%, por afrodescendentes, o que explica o fato dessa cidade ser a mais prevalente do Brasil (1,8%) para a infecção pelo HTLV-1 (DOURADO et al., 2003).



**Figura 1. Origem e disseminação do HTLV-1 baseada em análises filogenéticas e antropológicas.** PTLVs foram originados em primatas africanos e migraram para a Ásia onde, sofreram processos evolutivos, originando o STL-1. A linhagem inicial de STL-1 disseminou-se para Índia, Japão, Indonésia e de volta para a África (setas 1). Na Indonésia, os primeiros humanos infectaram-se, a partir de contatos interespecíficos com símios, e migraram para a Melanésia, dando origem ao HTLV-1 (subtipo c) (setas 2). Na

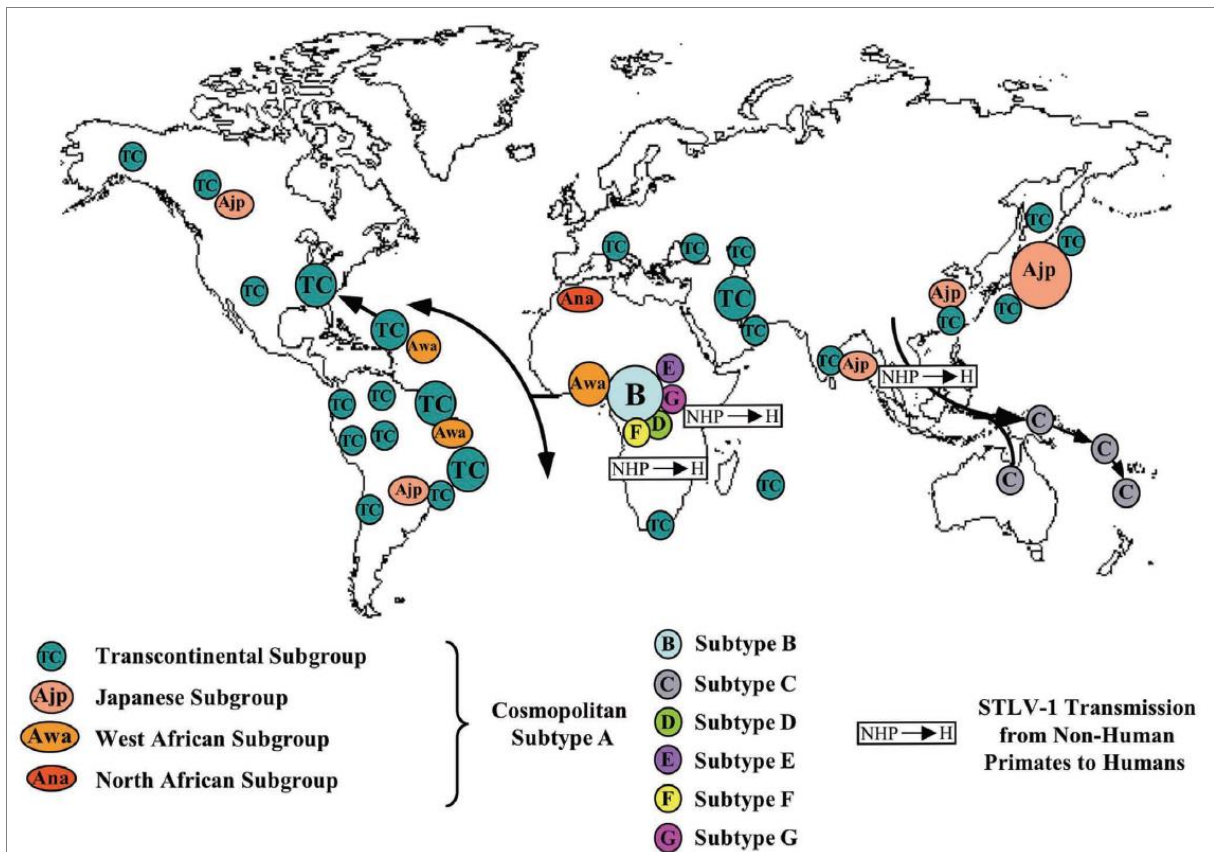
África, o HTLV-1 evoluiu, também através de transmissão interespecíes, originando HTLV-1 (subtipos a, b, d, e, f) (setas 3). Devido ao tráfico de escravos, o HTLV-1 (subtipo a) foi introduzido ao Novo Mundo e Norte da África (setas 4). (Adaptado de VERDONCK et al., 2007).

### 1.1.2 Classificação

O HTLV-1 pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e gênero *Deltaretrovirus*. Diferentemente dos outros retrovírus, o HTLV possui notável estabilidade genética, provavelmente devido ao mecanismo de expansão clonal, que é utilizado para amplificação viral, ao invés da transcrição reversa. A baixa variação nas sequências do HTLV-1 pode ser usada como uma ferramenta para traçar rotas migratórias de indivíduos infectados, além de permitir a inferência de novas evidências sobre origem, evolução e disseminação viral (GESSAIN; CASSAR, 2012; YANAGIHARA, 1991).

Análises baseadas em filogenia das regiões de repetições terminais longas (LTR) e do gene *env*, de sequências provenientes de diversas regiões geográficas, permitiram classificar o HTLV-1 em sete subtipos: **a** ou Cosmopolita, disseminado por todo o mundo, é endêmico no Japão, Caribe, América Central, América do Sul, Norte da África, África Ocidental e Oriente Médio. Devido sua grande dispersão, é dividido ainda em cinco subgrupos – A ou Transcontinental; B ou Japonês; C ou Norte-africano; D ou Oeste-africano e E isolado proveniente de negros do Peru; **b** ou Centro-Africano; **c** ou Melanésio, proveniente de indivíduos de Papua Nova

Guiné e de aborígenes australianos; **d** ou também Centro-Africano, porém isolados exclusivamente de Pigmeus e de dois indivíduos de Camarões e Gabão; **e**, isolado de um Pigmeu Efe Mbuti do Congo; **f**, isolado de um indivíduo do Gabão e **g**, poucas sequências relatadas, também isoladas da África Central (Figura 2) (GESSAIN et al., 1991; BASTIAN et al., 1993; HAHN et al., 1984; MIURA et al., 1994; VANDAMME et al., 1994; CHEN et al., 1995; MAHIEUX et al., 1997; MAHIEUX et al., 1998; SALEMI et al., 1998; WOLF et al., 2005; GASMI et al., 1994; VAN DOOREN et al., 1998; VIDAL et al., 1994).



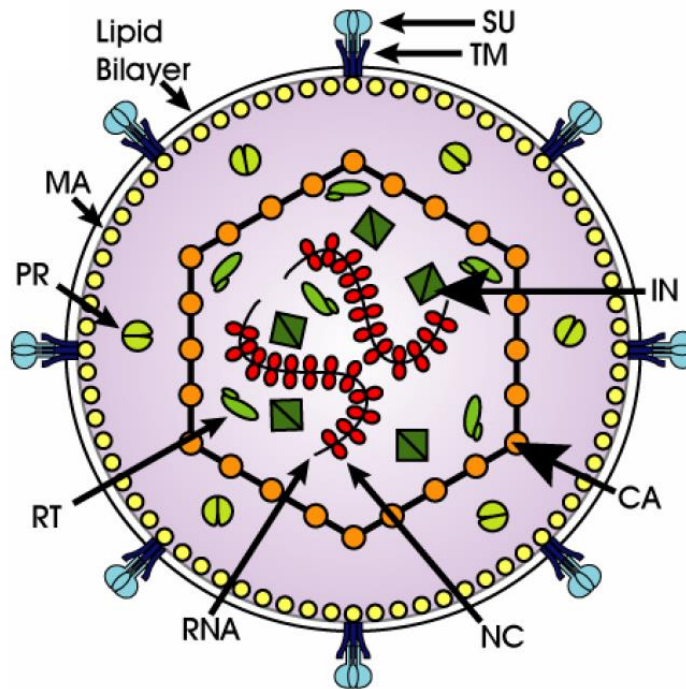
**Figura 2. Distribuição geográfica dos subtipos A-G e formas principais de disseminação do HTLV-1. NHP → H indicam provável transmissão interespecie do STLV de primatas não-humanos**



para Humanos na origem de alguns subtipos do HTLV-1. Subtipos A (subgrupado em TC – Transcontinental; Ajp – Japonês; Awa – Oeste-africano; Ana – Norte-africano), B, C, D, E, F e G (GESSAIN; CASSAR, 2012).

### *1.1.3 Estrutura morfológica e organização genômica*

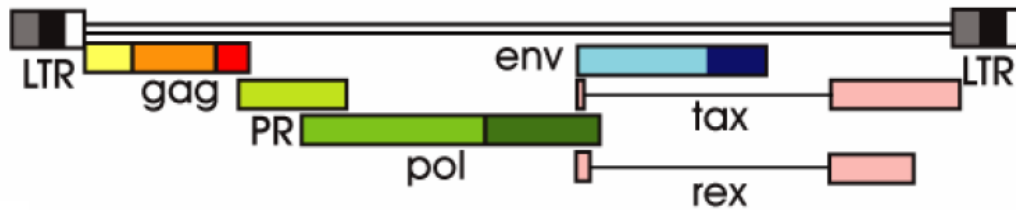
A estrutura do HTLV-1 é similar a de outros retrovírus, consistindo de um envelope, uma matriz proteica e um nucleocapsídeo. O vírus apresenta morfologia que varia de esférica a pleomórfica, medindo de 80 a 100nm de diâmetro. O envelope viral é composto por uma glicoproteína de superfície (SU) extracelular, denominada gp46, e uma glicoproteína transmembrana (TM), denominada gp21 que atravessa o envelope ancorando a proteína de superfície (Figura 3). Internamente, o envelope contém uma matriz proteica (MA), composta por proteínas gag e mais internamente um capsídeo (CA), de simetria icosaédrica. O capsídeo abriga no seu interior, o genoma viral composto por duas fitas de RNA diméricas de senso positivo, associadas a pequenas proteínas, denominadas proteínas do nucleocapsídeo (NC). Outras proteínas de fundamental importância para o estabelecimento da infecção, também estão presentes no interior do capsídeo, são elas: protease funcional (PR), transcriptase reversa (TR), que converte a molécula de RNA em DNA e a integrase (IN) que promove a inserção do DNA proviral no genoma da célula hospedeira (VERDONK et al., 2007; GOFF, 2001).



**Figura 3. Estrutura morfológica do HTLV-1.**

Esquema de uma partícula viral madura. Bicamada lipídica; SU – proteína de superfície (gp46); TM – proteína transmembrana (gp21); MA – matriz proteica; CA – capsídeo; NC – nucleocapsídeo; RNA – ácido ribonucleico; PR – protease; RT – transcriptase reversa; IN – integrase (VAN DOOREN, 2005).

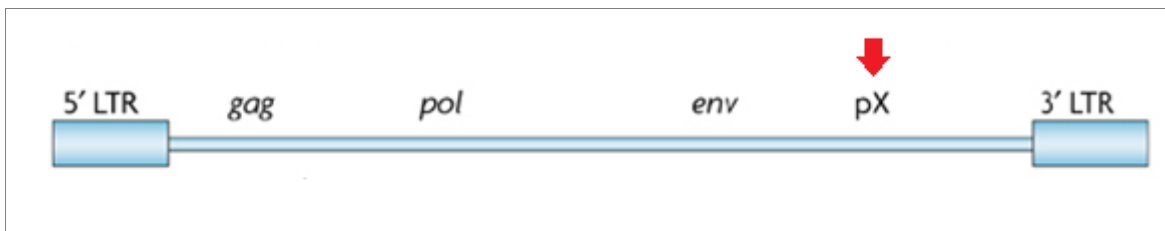
O genoma da HTLV-1 apresenta a estrutura básica dos retrovírus, sendo composto por quatro genes estruturais (*gag*, *pro*, *pol* e *env*), flanqueados por duas sequências LTR, essenciais à integração do DNA proviral ao genoma do hospedeiro e à sua regulação transcricional (Figura 4) (GREEN; CHEN, 2001; PESSÔA et al., 2014).



**Figura 4. Organização genômica do HTLV-1.**

Esquema representativo do genoma do HTLV-1: repetições terminais longas – LTR; genes estruturais – *gag*, *pro*, *pol* (PR) e *env*; genes regulatórios – *tax* e *rex*. (VAN DOOREN, 2005)

Adicionalmente, o HTLV contém uma sequência exclusiva, entre o gene *env* e a LTR 3', denominada região *pX* (Figura 5) onde quatro fases abertas de leitura (ORF – *Open Reading Frames*) são transcritas originando as proteínas regulatórias *tax* e *rex*, e proteínas acessórias (p12, p13, p30 e HBZ) que em conjunto, desempenham importante papel na infectividade e persistência viral (VAN PROOYEN et al., 2010; EDWARD et al., 2011; FUKUMOTO et al., 2009).



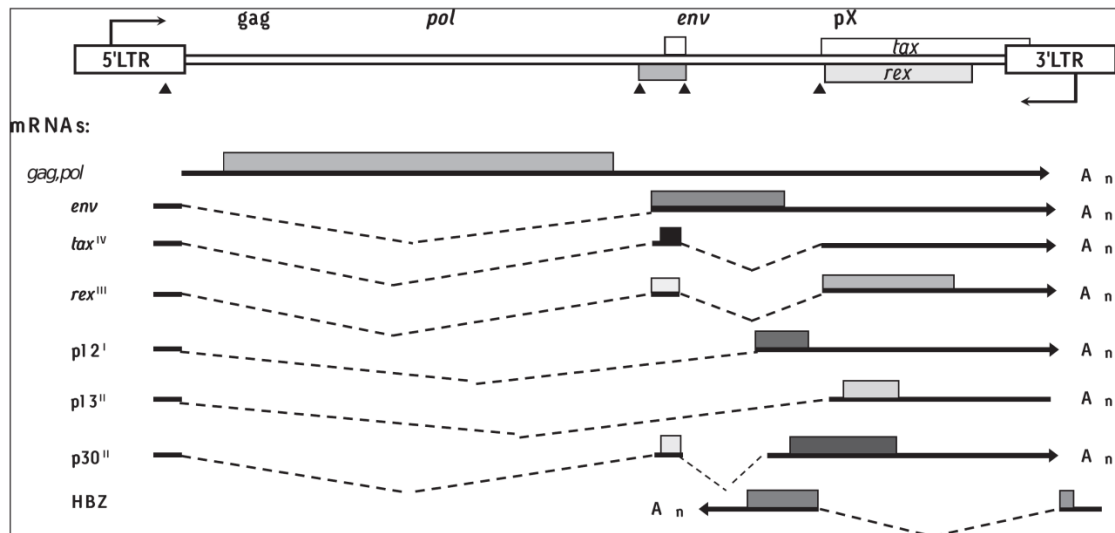
**Figura 5. Região *pX* no genoma do HTLV-1.** (Adaptado de MATSUOKA & JEANG, 2007)

O DNA proviral do HTLV-1 possui 9032bp e três tipos de mRNA são transcritas a partir dele. Uma fita de mRNA de sequência completa sintetiza os produtos dos genes *gag* e *pol*, além do RNA genômico que é empacotado na partícula viral. A proteína precursora *gag* (53kD) após sintetizada, é clivada pela protease viral originando as proteínas *gag* maduras: p19 – matriz (MA), p24 - capsídeo (CA) e

p15 - nucleocapsídeo (NC). O produto do gene *pro*, por sua vez, é gerado por um desvio de leitura dos genes *gag* e *pol*, resultando na protease, que além de atuar na clivagem e separação das proteínas Gag e Pol, é responsável por seu próprio processamento, gerando a molécula Pro madura (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002).

O gene *pol* codifica, na sua porção 5', a transcriptase reversa (TR), enzima responsável pela conversão do RNA genômico em DNA proviral, e pela remoção da fita de RNA molde, após a síntese do DNA, devido sua atividade de RNase H; em sequências "downstream", este gene codifica a integrase (IN), enzima responsável pela integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira, através da clivagem do DNA celular e posterior ligação com o DNA viral. (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002)

As outras duas moléculas de mRNA, transcritos a partir do DNA proviral, são subgenômicas e sofrem processamento (*splicing*) após sua síntese. O primeiro mRNA subgenômico é sintetizado a partir de uma única etapa de processamento (*splicing*) e corresponde ao gene *env*. Este gene codifica a proteína precursora Env que, ao ser clivada, por protease celular, origina as glicoproteínas gp46 (SU) de 46kD e gp21 (TM) de 21kD. A ligação entre as proteínas do envelope é não covalente, assim como em outros retrovírus. O segundo mRNA subgenômico é produzido pela remoção de dois íntrons e codifica as proteínas regulatórias da região pX (Figura 6) (GHEZELDASHT et al., 2013).



**Figura 6. Representação esquemática do genoma do HTLV-1: mRNAs e processamento (IARC, 1996)**

As proteínas regulatórias Tax (40kD) e Rex (27/21kD) são codificadas, respectivamente, pelas ORFs IV e III, localizadas na região pX, que sintetizam uma molécula de mRNA policistrônico, duplamente processado, por *splicing alternativo* (KORALNIK et al., 1992). Tax atua como transativador transcricional do HTLV-1, estimulando a expressão de genes virais, através de sua interação com fatores celulares e com a região LTR do genoma proviral (BRADY et al., 1987). Como Tax, a proteína Rex atua, através de eventos pós-transcricionais, também regulando a expressão de genes virais (CANN; CHEN, 1996), especificamente, reconhecendo elemento resposta, específico de mRNAs parcialmente processados, estabilizando-os e inibindo, assim, seu processamento completo e degradação; Rex utiliza o sistema celular da exportina CRM-1 para exportação desses mRNAs do núcleo para o citoplasma. Por outro lado, Rex exerce um efeito

negativo sobre o processamento e transporte de mRNAs duplamente processados, que codificam para a própria proteína Rex, para Tax e para as proteínas acessórias, favorecendo o acúmulo de proteínas estruturais e enzimáticas. Rex também pode interferir nas funções da célula hospedeira em diferentes níveis, ao afetar a transcrição e a tradução de vários genes celulares (FRANCHINI, 1995; FRANCHINI; STREICHER, 1995; FERREIRA et al., 1997).

As ORFs I e II codificam quatro proteínas acessórias (p12/p8 e p30/p13 respectivamente) por *splicing* alternativo de seus mRNAs (CIMINALE et al., 1992; KORALNIK et al., 1992). Estudos prévios indicam a importância destas proteínas acessórias na patogênese das doenças associadas ao HTLV-1, sugerindo, por exemplo, que os produtos das diferentes ORFs podem conferir vantagem proliferativa às células infectadas pelo HTLV-1 e influenciar na infectividade viral (GAUDRAY et al., 2002; NICOT et al., 2004; FUKUMOTO et al., 2009). p30 é uma proteína que atua como regulador transcricional e pós-transcricional da expressão viral (NICOT et al., 2004). Estudos recentes demonstraram que essa proteína diminui a sinalização via receptores *tool-like* 3 e 4 (TLR3 e TLR4) em monócitos humanos e células dendríticas (FENIZIA et al., 2014). p13, por sua vez, aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelas mitocôndrias (SILIC-BENUSSI et al., 2010), modelando o potencial de membrana dessa organela e interferindo na absorção de cálcio (BIASOTTO et al., 2010). Os produtos da ORF I serão mais detalhadamente abordados, em seção específica desta revisão.

#### *1.1.4 Ciclo de multiplicação viral*

O HTLV-1 apresenta tropismo por células T CD4<sup>+</sup>. Entretanto, este vírus também é capaz de infectar células T CD8<sup>+</sup>, além de monócitos, células B, células dendríticas, macrófagos e células endoteliais (HANON et al., 2000; KOYANAGI et al., 1993; KNIGHT et al., 1993; SETOYAMA et al., 1998).

O ciclo de multiplicação do HTLV-1 (Figura 7), de modo similar aos outros retrovírus, inicia-se com a ligação da SU, via domínio de ligação ao receptor (RBD), ao transportador de glicose de classe 1 (GLUT-1), que atua como receptor para esta proteína, na superfície da célula alvo, e à molécula correceptora proteoglicano heparan-sulfato (HSPG) (PINON et al., 2003; MANEL et al., 2005; GHEZ et al., 2006). Após a ligação da SU, uma sequência de eventos desencadeia a mudança conformacional na TM, necessária para a introdução do capsídeo viral no citoplasma da célula hospedeira. A entrada do vírus pode ocorrer por dois mecanismos: (1) fusão do envelope viral com a membrana da célula, levando à perda do capsídeo e à liberação do cerne contendo o genoma viral no citoplasma ou (2) endocitose (TANGY, 1996; VOYLES, 1993). Após a liberação do cerne viral no citoplasma, o RNA da partícula é utilizado como molde para a síntese de uma molécula de DNA, por transcrição reversa através da enzima TR ainda no cerne do vírus. O provírus, como o DNA passa a ser chamado, será integrado ao genoma da célula hospedeira pela enzima integrase. O DNA proviral, recém-sintetizado, serve como molde para a síntese dos três tipos de mRNA produzidos pelo HTLV-1, os quais traduzirão as proteínas estruturais e regulatórias necessárias para a formação de uma nova partícula viral (GELMANN

et al., 1984; SHIMOTOHNO et al., 1985; CIMINALE et al., 1992; FERREIRA et al., 1997).

A maturação viral sucede a montagem e o brotamento, consistindo de um processo complexo, onde a clivagem proteolítica das proteínas do capsídeo dará origem a uma nova partícula infecciosa.

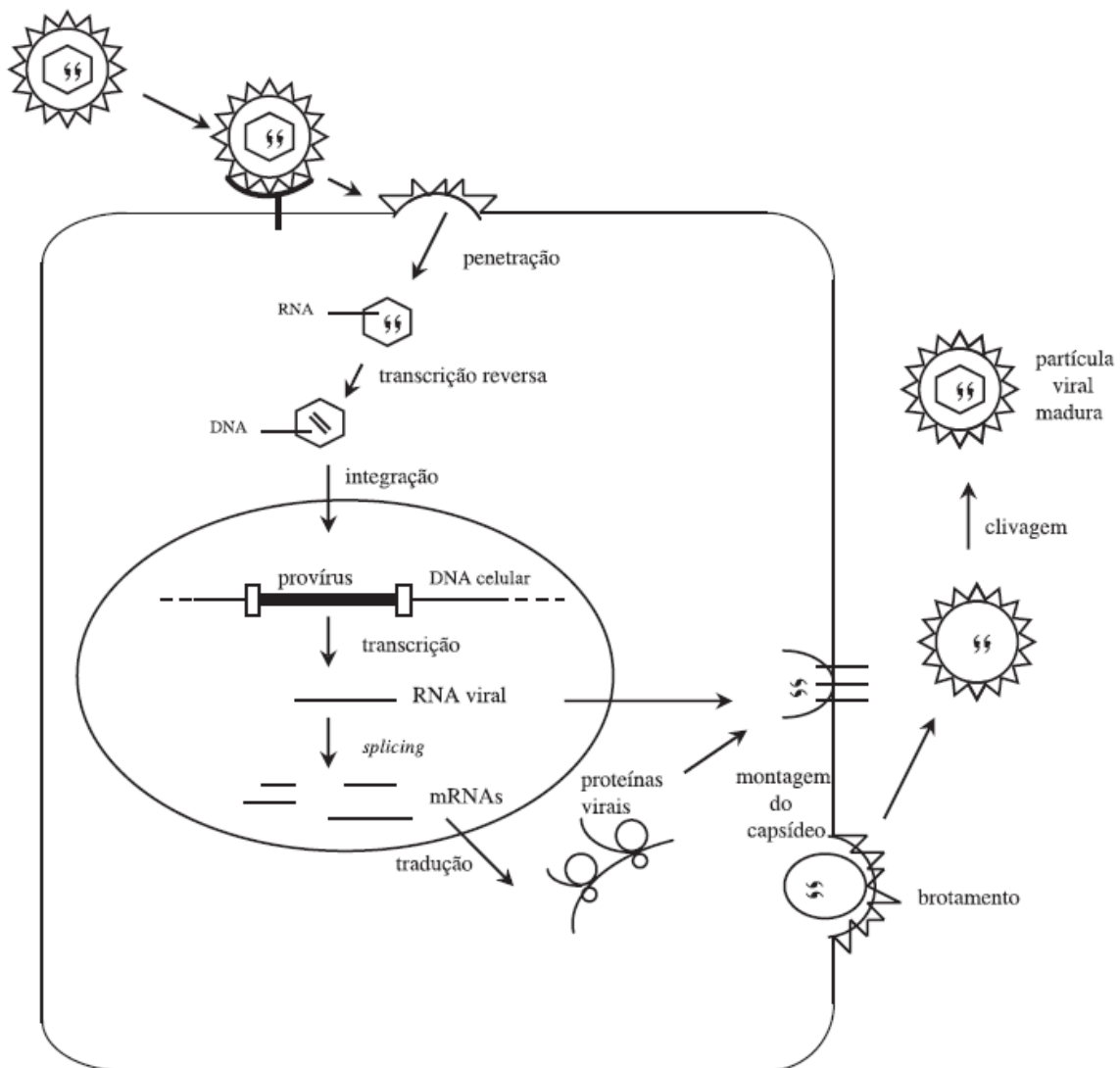


Figura 7. Ciclo básico de multiplicação de um retrovírus. (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2006)



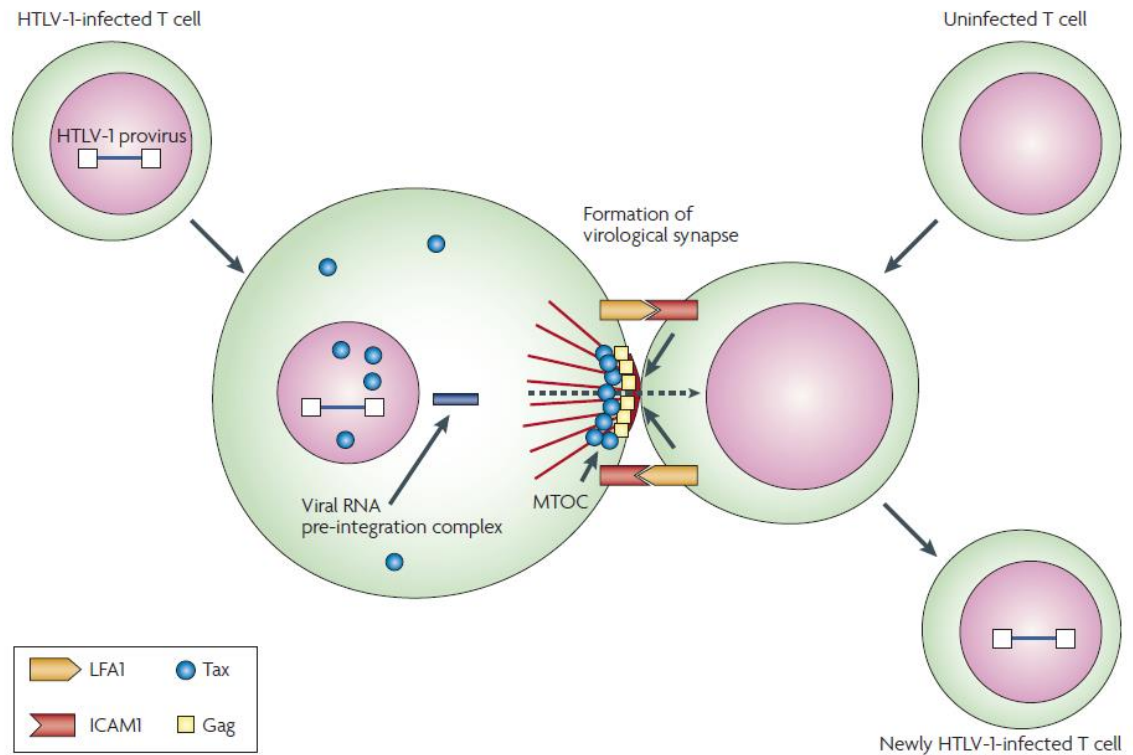
### *1.1.5 Transmissão viral e disseminação*

O HTLV-1 é transmitido por três vias principais: (1) vertical, quando a transmissão ocorre da mãe para o filho, que pode ser através da amamentação – forma de transmissão mais eficiente –, por transmissão transplacentária ou durante o parto; (2) horizontal, através do contato sexual, sendo a transmissão do homem para a mulher mais efetiva; e (3) parenteral, através de transfusão de sangue e hemoderivados contaminados, compartilhamento de seringas e/ou perfuro cortantes também contaminados (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002).

Na corrente sanguínea, o vírus tem predileção pelos linfócitos TCD4<sup>+</sup>, devido às moléculas correceptoras HSPGs. No entanto, o HTLV-1 não se replica pelo modelo clássico dos retrovírus, diversos estudos demonstraram que mecanismo principal de disseminação intra-hospedeiro não se dá através de partículas virais livres, mas por expansão clonal das células infectadas, por mitose (CIMARELLI et al., 1996; WATTEL et al., 1995; WATTEL et al., 1996). Essa é a explicação para os baixíssimos ou inexistentes níveis séricos dessas partículas em indivíduos infectados. Além disso, a infectividade das partículas livres é muito menor quando comparado com a de células infectadas (LAIRMORE et al., 1989; MAEDA et al., 1984; POPOVIC et al., 1982; YAMAMOTO et al., 1982; PIQUE; JONES, 2012; MATSUOKA, JEANG, 2007).

A transmissão do HTLV-1 através do contato célula-célula se dá numa série de eventos denominada sinapse virológica (SV) (BANGHAM, 2003). Quando uma célula infectada entra em contato com uma célula não infectada, o centro de organização microtubular (MTOC) polariza-se na junção célula-célula,

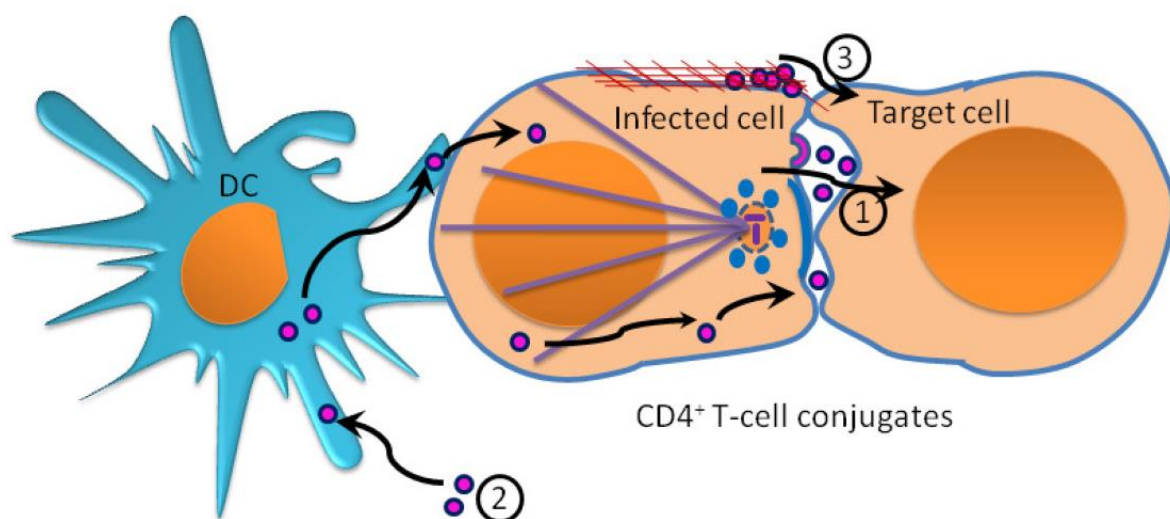
promovendo o acúmulo de proteínas Gag e de moléculas de RNA genômico nessas regiões, permitindo a passagem de partículas virais entre elas (Figura 8) (MATSUOKA, JEANG, 2007).



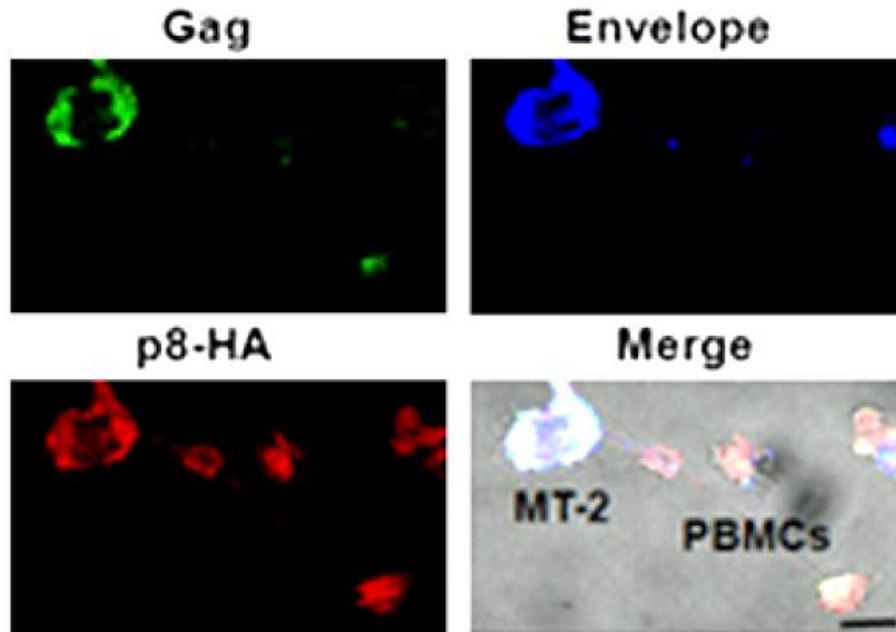
**Figura 8. Sinapse Virológica.** (MATSUOKA; JEANG, 2007)

Além da sinapse virológica, outros modelos para disseminação viral têm sido descritos, como a formação de biofilmes-like, onde há deposição de uma matriz extracelular constituída de carboidratos e proteínas de adesão que abrigam partículas virais (Figura 9) (NEJMEDDINE; BANGHAM, 2010; PAIS-CORREIA et

al., 2010); e também a formação de condutas celulares (Figura 10), recentemente demonstrados por Van Prooyen e colaboradores (2010).



**Figura 9. Mecanismos de disseminação do HTLV-1.** (1) Sinapse virológica; (2) Modelo clássico de infecção viral; (3) Biofilme-like (NEJMEDDINE; BANGHAM, 2010).

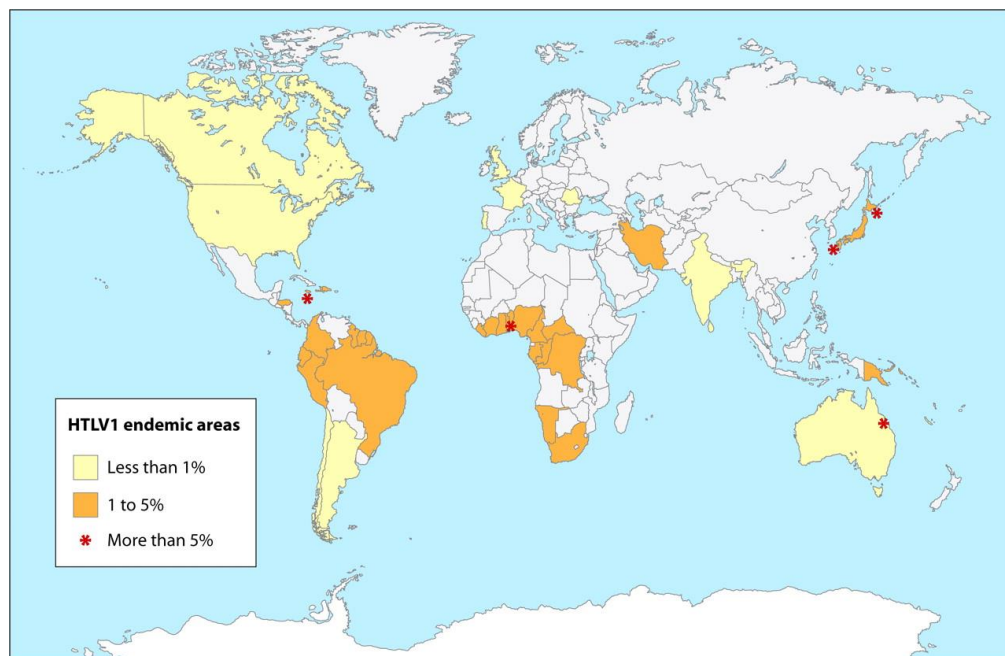


**Figura 10. Formação dos conduítes celulares.** Transferência de proteínas Gag, Env e p8 de uma célula infectada (MT-2) para uma célula não infectada (VAN PROOYEN, 2010).

#### 1.1.6 Epidemiologia da infecção pelo HTLV-1

De acordo com estudos epidemiológicos, estima-se que 15 – 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 no mundo (DE THE & BOMFORD, 1993; GESSAIN; CASSAR, 2012), entretanto, a infecção restringe-se a regiões que constituem áreas endêmicas como o sudoeste do Japão, África Central, Caribe, América Central e do Sul e Ilhas Melanésias (Figura 11) (EDLICH, 2003). As taxas de soroprevalência também diferem de uma região para outra, podendo variar de 0,1% a 37% (YAMAGUCHI, 1994; MUELLER, 1991), sendo influenciadas não apenas pela localização geográfica, mas também pela composição sociodemográfica da população estudada e por comportamentos de risco

individuais (CATALAN-SOARES & PROIETTI, 2006). O sudoeste do Japão apresenta as maiores taxas de soroprevalência (37%), contrastando com prevalências menores como as de países do Caribe (Trinidad e Jamaica – 6%) (HANCHARD et al., 1990; MURPHY et al., 1991), da África Sub-Saariana, (Benin, Camarões e Guiné-Bissau – 5%) (DUMAS et al., 1991; GESSAIN; DE THE, 1996;) e de áreas do Irã e Ilhas Melanésias (menor que 5%) (MUELLER,1991; MANN, 1999).



**Figura 11. Distribuição Geográfica do HTLV-1: países endêmicos.** (GONÇALVES et al., 2010)

No Brasil estima-se que aproximadamente 2,5 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 e, devido à sua extensão territorial e ao tamanho da população, é considerado o país com o maior número absoluto de portadores do vírus (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002).

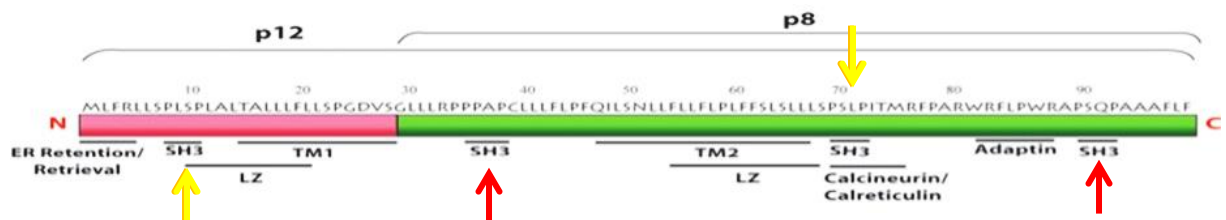
A primeira descrição da infecção pelo HTLV-1 no país se deu na cidade de Campo Grande (MS), em japoneses oriundos de Okinawa, sul do Japão, com soroprevalência de 13% (KITAGAWA et al., 1986). Em 1989, outro estudo conduzido nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo, envolvendo profissionais do sexo da zona rural e hemofílicos apresentou positividade para o HTLV-1 de 1% e 13%, respectivamente, nesses grupos (CORTES et al., 1989). Já em 1997, Galvão-Castro e colaboradores demonstraram heterogeneidade na prevalência da infecção pelo HTLV-1 em doadores de sangue provenientes das diferentes regiões geográficas brasileiras: norte e sul – 0,08% (Manaus e Florianópolis); nordeste e sudeste – 0,33%, com destaque para a cidade de Salvador (BA) – 1,35% (GALVÃO-CASTRO et al., 1997). Corroborando com estes dados, Dourado e colaboradores demonstraram que a soroprevalência para o HTLV-1 na cidade de Salvador é de 1,8%, através de estudo de base populacional; sendo mais elevada para mulheres (2%) quando comparado com indivíduos do sexo masculino (1,2%) com idade até 50 anos, quando as taxas passam para 9% e 6,3% nos sexos masculino e feminino, respectivamente (DOURADO et al., 2003).

## 1.2 OS PRODUTOS DA ORF-I

O RNAm unicamente processado (*single spliced*) proveniente da ORF-I codifica a proteína p12, que contém 99 aminoácidos e caracteriza-se por sua alta hidrofobicidade (KORALNIK et al., 1992; FRANCHINI, 1995). A proteína p12 foi

detectada em células de linhagem infectadas com HTLV-1, em macrófagos infectados *in vitro* (ALBRECHT et al., 2002; GAUDRAY et al., 2002) e em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de indivíduos infectados (FRANCHINI et al., 2003; FUKUMOTO et al., 2009). Ademais, linfócitos T citotóxicos (PIQUE et al., 2000) e soro de indivíduos e coelhos infectados pelo HTLV-1 (DEKABAN, et al., 2002) também apresentaram reatividade contra peptídeos derivados dessa ORF, mostrando evidências de que esses indivíduos desenvolvem resposta imune contra seus produtos proteicos.

A proteína p12 possui dois domínios transmembranares putativos e quatro regiões curtas (*motifs*) ricas em prolina (PXXP) (Figura 12), que constituem domínios de ligação SH3, comumente encontrados em proteínas envolvidas em vias de sinalização intracelular, sendo os *motifs* PXXP 1 e 3 altamente conservados entre as sequências virais (FRANCHINI, 1995).



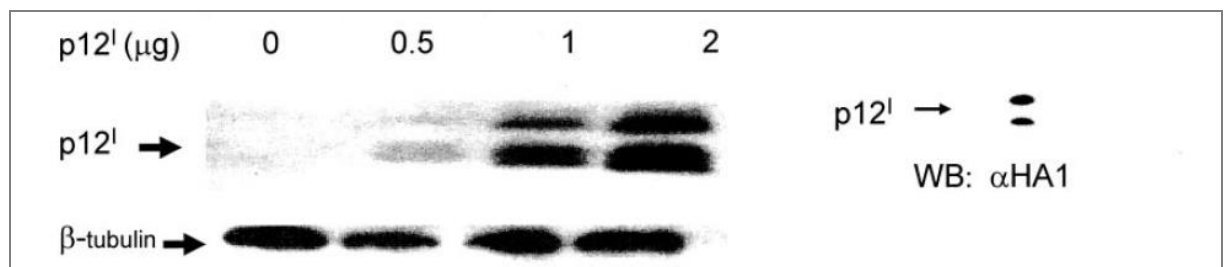
**Figura 12. Desenho esquemático da estrutura primária das proteínas p12/p8.**

Domínios funcionais (*motifs*). Domínios de ligação SH3 (setas). Domínios 1 e 3, altamente conservados (setas amarelas).

Duas isoformas de p12 foram descritas: a isoforma p12K88, comumente encontrada em indivíduos TSP/HAM, contém o aminoácido lisina na posição 88, é

ubitiquinada e conduzida à degradação por proteassoma; já a isoforma mais estável, p12R88, encontrada em isolados de indivíduos ATLL e carreadores assintomáticos, contém, na mesma posição, o aminoácido arginina e não é ubitiquinada (TROVATO et al., 1999; EDWARDS et al., 2011). Estudos demonstraram que p12 localiza no compartimento de endomembranas residindo no retículo endoplasmático (RE), complexo de Golgi e balsas lipídicas (JOHNSON et al., 2001; DING et al., 2002; FUKUMOTO et al., 2007)

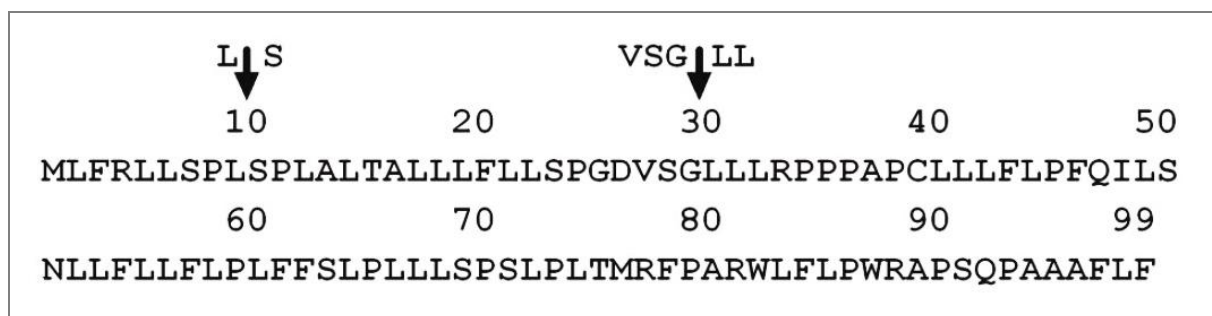
O mRNA, da ORF-I resulta na expressão de duas bandas proteicas distintas (8kDa e 12kDa), quando analisadas por *Western Blot* (WB) (Figura 13). A partir desses achados, Fukumoto e colaboradores (2009) através de ferramentas de bioinformática analisaram a sequência de aminoácidos de p12 e predisseram dois possíveis sítios para clivagem proteolítica desta proteína, entre os aminoácidos 9-10 e 29-30; e a análise de mutações, induzidas nos sítios preditos, demonstrou que essas mutações influenciam na sub-localização celular da proteína.



**Figura 13. Expressão de p12 por *Western Blot*.** (Adaptado de FUKUMOTO et al., 2007).



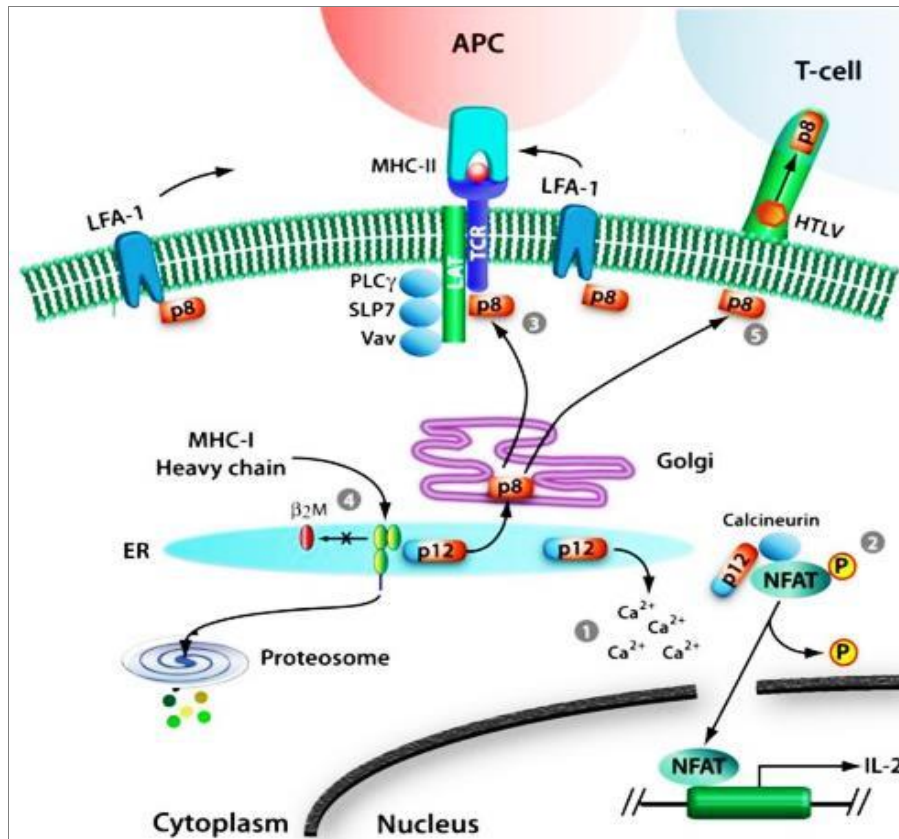
Vírus como o HTLV-1 carregam informação genética limitada em seus genomas e, devido a isso, exploram mecanismos de modificação pós-traducional para exercerem suas diversas funções (FUKUMOTO et al., 2009). O estudo, anteriormente citado, elucidou as modificações pós-traducionais sofridas pela proteína p12, explicando o aparecimento das duas bandas proteicas por WB. O produto de 99 aminoácidos da ORF-I sofre duas clivagens proteolíticas na sua região aminoterminal. A primeira clivagem entre os aminoácidos 9 e 10 (PL↓SP), remove o sinal de retenção não-canônico ao RE (LFRL), localizado entre os cinco primeiros aminoácidos, permitindo o tráfego do produto para o complexo de Golgi, onde a segunda clivagem, entre os aminoácidos 29 e 30 (VSG↓LL), ocorre (Figura 14). A segunda clivagem gera o produto de 8kDa, referido como p8, que dirige-se para a membrana plasmática, sendo recrutada para a sinapse imunológica (SI) (FUKUMOTO et al., 2009).



**Figura 14. Sequência de aminoácidos de p12/p8.** Sítios de clivagem proteolítica entre os aminoácidos 9 e 10; e 29 e 30. (Adaptado de FUKUMOTO et al., 2009)

Estudos demonstraram que a proteína p12 possui propriedades oncogênicas, pois induz a transformação de fibroblastos murinos, quando em cooperação com a proteína E5 do papiloma vírus bovino. (SCHLEGEL et al., 1986; FRANCHINI et al., 1993; NELSON et al., 1989; FINBOW et al., 1991; GOLDSTEIN et al., 1991; DING et al., 2001).

Além dessas interações, p12, associa-se fisicamente, no ambiente do RE, à porção citoplasmática da cadeia  $\beta$  e à porção transmembranar da cadeia  $\gamma$  do receptor de interleucina 2 (IL2-R), retendo-os e aumentando a fosforilação do sinalizador de transdução e ativador da transcrição 5 (STAT5), o que diminui o limiar de ativação das células T, aumentando sua responsividade à interleucina 2 (IL-2) (MULLOY et al., 1996; NICOT et al., 2001; DEKABAN et al., 2002; DING et al., 2003; FUKUMOTO et al., 2009). Também, a ligação de p12 às cadeias pesadas recém-sintetizadas do Complexo Principal de Histocompatibilidade classe I (MHC-I), previne a associação deste, com a  $\beta$ 2-microglobulina, direcionando-o para degradação pelo proteassoma, diminuindo, assim, sua expressão na superfície celular e a apresentação de peptídeos imunogênicos, resultando numa forma de escape da resposta imune do hospedeiro. p12 também atua sobre o fator nuclear de ativação de células T (NFAT), através do aumento do cálcio citoplasmático por ativação das proteínas cálcio-dependente, residentes do RE, calrreticulina e calnexina (Figura 15) (DING et al., 2001).

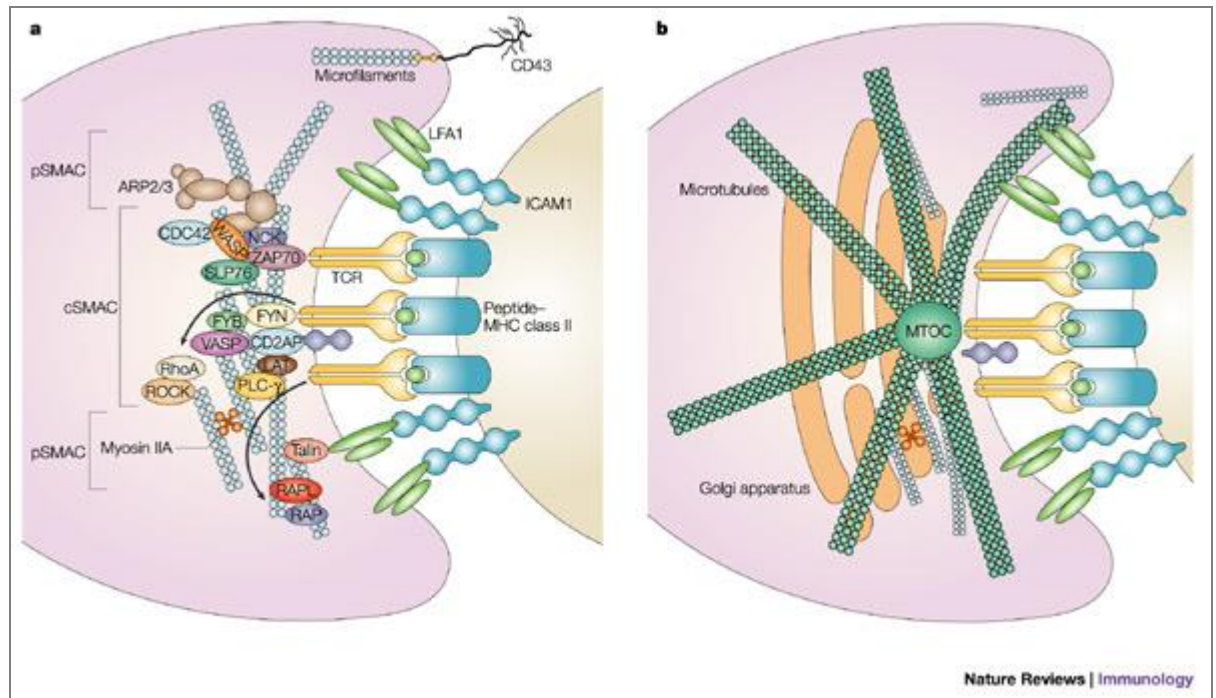


**Figura 15. Esquema das funções atribuídas a p12/p8.** MHC-I (Complexo Principal de Histocompatibilidade, classe I), MHC-II (Complexo Principal de Histocompatibilidade, classe II), TCR (Receptor de células T), RE (Retículo Endoplasmático), NFAT (Fator Nuclear de Ativação de Células T), IL-2 (Interleucina 2), P (Indica eventos de fosforilação) (EDWARDS et al., 2011).

A sinapse imunológica consiste de uma estrutura complexa onde ocorre a ligação do receptor de células T (TCR) através de peptídeos do MHC a uma célula apresentadora de antígenos (APC) (Figura 16). Outras moléculas como proteínas tirosina-quinases e o ligante para ativação de células T (LAT) também participam da SI. Nesse contexto, em contraste às funções de p12, p8 liga-se ao TCR, regulando negativamente sua sinalização proximal, num evento LAT-dependente (Figura 15) (FUKUMOTO et al., 2009); p8 também aumenta a agregação do

antígeno associado à função linfocitária 1 (LFA-1) e em conjunto, esses eventos resultam numa baixa produção viral, evasão do sistema imune pelo reconhecimento por células *natural killers* (NK) e linfócitos citotóxicos (TCD8<sup>+</sup>), além do recrutamento de células não-infectadas (MALBEC et al., 2011).

Recentemente, Van Prooyen e colaboradores (2010) demonstraram que p8 induz a formação e o aumento do número e do comprimento de prolongamentos citoplasmáticos, denominados conduítes celulares, que promovem a comunicação entre diferentes tipos de células. Através destes conduítes, partículas virais e a própria proteína p8 são rapidamente transferidos de uma célula infectada para outra célula, não infectada. Na nova célula infectada, p8 também induz a formação de conduítes celulares, aumentando o contato celular, além de promover anergia celular contribuindo para evasão do sistema imune do hospedeiro (VAN PROOYEN et al., 2010; MALBEC et al., 2011).



**Figura 16. Sinapse imunológica e ativação de células T.** (VINCENTE-MANZANARES; SÁNCHEZ-MADRI; 2004)

Apesar das proteínas p12/p8 aparentarem ser dispensáveis para a replicação ou imortalização de linfócitos *in vitro* (DERSE et al., 1997; ROBEK et al., 1998; FURUKAWA et al., 2004) é possível que elas tenham um papel essencial no estabelecimento de uma infecção viral persistente *in vivo* (VAN PROOYEN, et al., 2010; VALERI et al., 2010; MALBEC et al., 2011).

Estudos recentes demonstraram que a análise dos produtos da ORF-I de pacientes infectados pelo HTLV-1 apresentavam importantes substituições de aminoácidos que afetavam o padrão de clivagem dessas proteínas, sugerindo que as funções de p12 relacionadas ao RE e à membrana podem contribuir para a

sobrevivência e proliferação das células infectadas no hospedeiro (FUKUMOTO et al., 2009).

Com o intuito de verificar possíveis associações entre mutações na ORF-I, o padrão de clivagem da p12, a carga proviral e o perfil clínico (assintomático ou TSP/HAM) de indivíduos infectados pelo HTLV-1, foi iniciado, no laboratório da Dra. Genoveffa Franchini – (Instituto Nacional do Cancer (NCI)/ Instituto Nacional de Saúde (NIH)/EUA) – um estudo denominado “*ORF-I polymorphism in HTLV-1 infected individuals*” (*in press*), no qual foi feita a análise de mutações de vários clones da ORF-I do vírus, a partir de amostras de indivíduos infectados com diferentes cargas provirais.

A região do gene *pX* do HTLV-1 correspondente à ORF-I foi amplificada por PCR, a partir de PBMCs de 163 indivíduos infectados (85 assintomáticos e 78 com TSP/HAM), provenientes de diferentes regiões geográficas do mundo. Em seguida, foram realizados clonagem e sequenciamento de 1.640 clones. A maioria dos pacientes (73%) carregavam mutações na ORF-I que resultaram na maior expressão da forma não clivada p12 do que p8. A mais alta variabilidade genética dentro da ORF-I foi vista dentro do domínios transmembranares da proteína. Uma subclasse de mutações foi mais frequente nos pacientes com TSP/HAM quando comparados com os assintomáticos. Enquanto cargas provirais mais elevadas foram demonstradas nos pacientes com TSP/HAM ( $p=0.0001$ ), nenhuma correlação foi observada entre carga proviral e isoformas da ORF-I expressas (predominantemente p12, p12 e p8 em concentrações aproximadamente iguais e

predominantemente p8), mas observou-se que os pacientes com TSP/HAM possuíam mais mutações na ORF-I que expressavam p12 e p8 igualmente.

Ensaio funcionais também foram realizados com o intuito de verificar o padrão de expressão das proteínas p12 e p8 como resultado das mutações observadas, assim como a co-localização celular destas proteínas. Para isso, mutações pontuais que correspondem àquelas encontradas em p12 (D26N, G29S,  $\Delta$ 29, P34L,  $\Delta$ 5-L6M/G29S/P34I/F61L), presentes nos provírus dos pacientes foram introduzidas no vetor de expressão pME18SDSL-HAtag descrito por Fukumoto e colaboradores (2007).

Foi observada a predominância de marcação do antígeno HA-p12/p8 no RE das células HeLa transfectadas com os mutantes que expressavam mais p12 e a predominância do antígeno HA-p12/p8 no citoplasma e membrana das células transfectadas com os mutantes que expressam mais p8, demonstrando que a proteína p12 é encontrada principalmente no retículo endoplasmático e a proteína p8 no citoplasma e na membrana celular (DING et al., 2001; FUKUMOTO et al., 2007; FUKUMOTO et al., 2009).

### 1.3 INTERAÇÃO COM PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO

Considerando a necessidade da formação da sinapse virológica, de biofilmes e/ou de conduítes para a transmissão do vírus através do contato célula-célula, mecanismos como a polarização de proteínas do citoesqueleto celular e de

moléculas de adesão para o sítio de contato, mostram-se importantes na transmissão do HTLV-1 (IGAKURA et al., 2003). Estruturas especializadas, denominadas adesões focais, proporcionam uma ligação física entre a matriz extracelular e o citoesqueleto baseado em actina (TURNER, 1998). As adesões focais incluem receptores transmembrana conhecidos como integrinas, que também interagem através de seus prolongamentos citoplasmáticos com um complexo proteico estrutural (Figura 17). Adicionalmente, nos sítios de adesão focal, concentram-se proteínas regulatórias, como quinases e fosfatases, que participam da transdução do sinal recebido, direcionando a modulação da adesão e a expressão gênica (TURNER, 1998; SCHALLER, 2001; DEAKING)

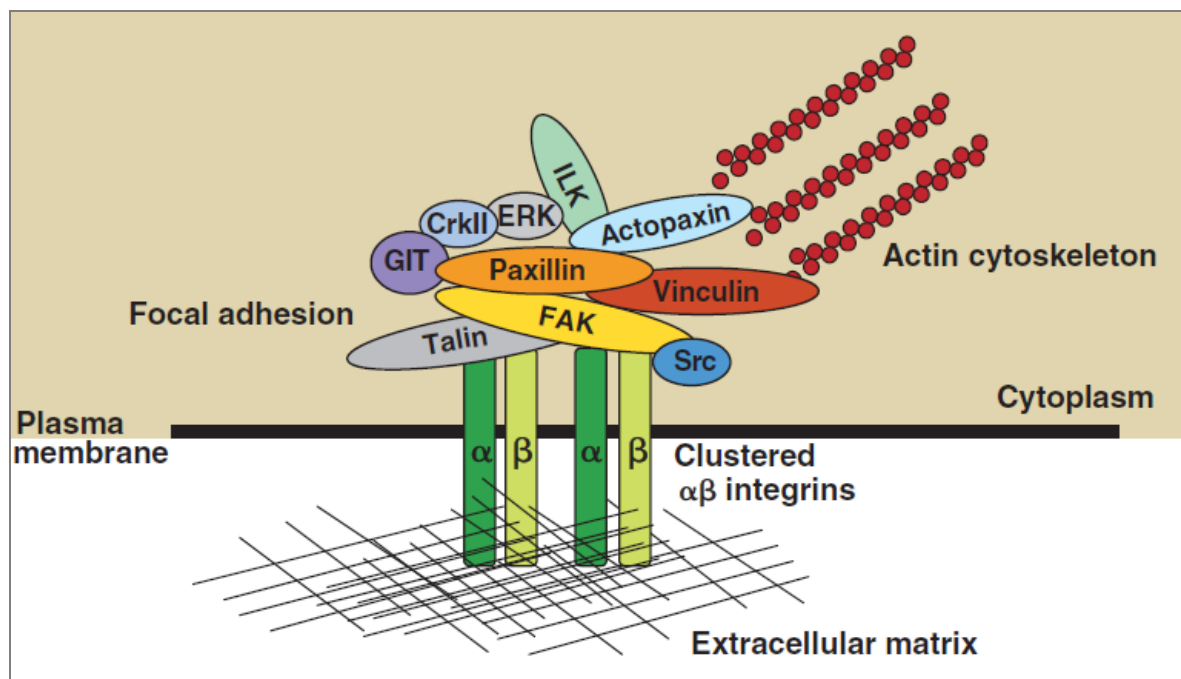
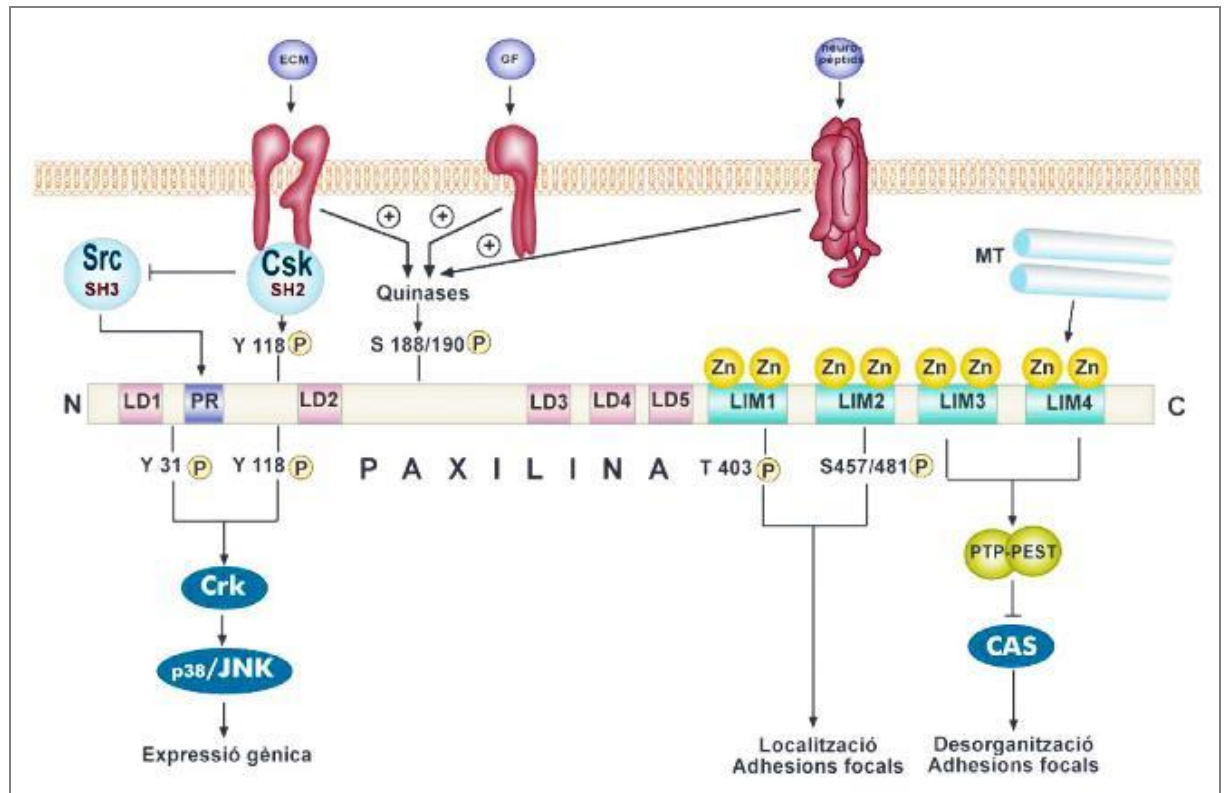


Figura 17. Esquema proteico da adesão focal.

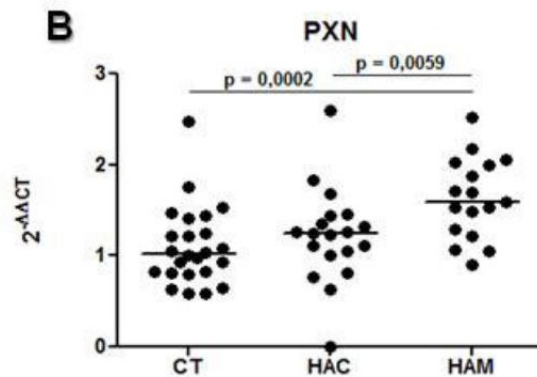


Uma das proteínas associadas à adesão focal é a Paxilina, uma molécula multidomínio, de 68kDa, codificada pelo gene *pxn*, que contém sítios de ligação para muitas proteínas regulatórias. Esta proteína é ubíqua e alguns de seus sítios estão disponíveis para interação com seus ligantes apenas quando a Paxilina está fosforilada, como outras proteínas de citoesqueleto. Seu papel principal nas adesões focais é funcionar como andaime, facilitando a interação entre outras proteínas como Talina e Vinculina.. (TURNER, 1998).

A Paxilina pode ser dividida em dois distintos domínios estruturais. O primeiro domínio compreende 325 aminoácidos N-terminais e contém sítios de ligação para Talina, Vinculina e para a quinase de adesão focal (FAK). Estudos nesses sítios de ligação revelaram a presença de cinco domínios leucina-aspartato (LD). Entre os domínios LD1 e LD2 existem regiões ricas em prolina que, assim como p12/p8, interagem com domínios SH3. O segundo domínio, na porção carboxi-terminal, é composto exclusivamente por quatro domínios LIM importantes na interação entre proteínas do citoesqueleto. O terceiro domínio LIM é essencial para direcionar a Paxilina aos sítios de adesão focal (Figura 18) (TURNER, 1998; SCHALLER, 2001).



Em um estudo realizado por Pinto (2011), através da técnica de PCR em Tempo Real, foi demonstrado que a expressão do gene *pxn* foi 1,5 vezes maior em indivíduos TSP/HAM, em comparação com indivíduos não infectados, e 1,3 vezes mais expressos em indivíduos TSP/HAM em relação a indivíduos HTLV-1+ assintomáticos (Figura 19), sugerindo que a Paxilina possa ter um papel relevante tanto na infecção pelo HTLV-1 quanto na patogênese associada ao vírus.

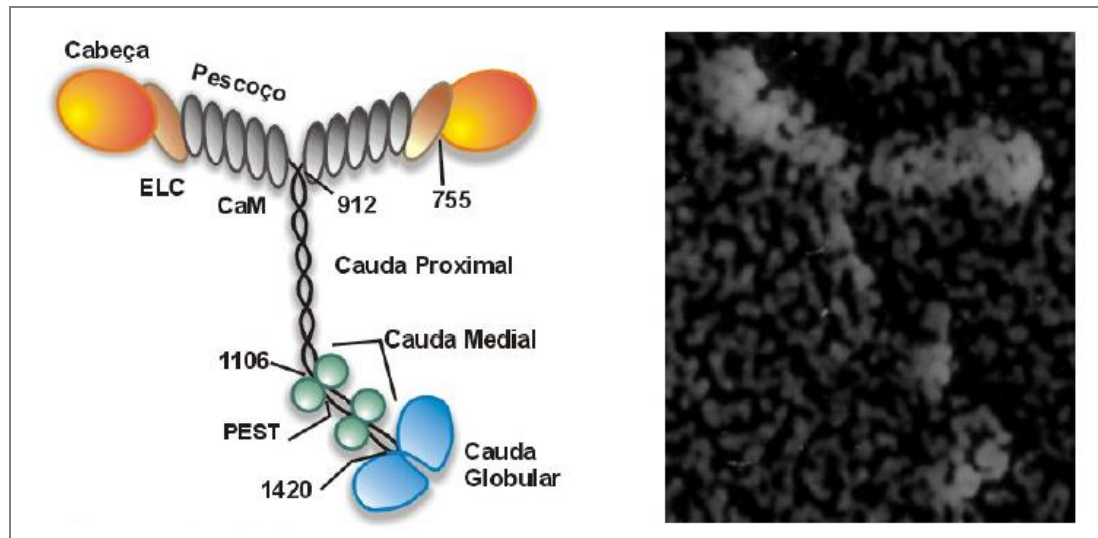


**Figura 19. Resultado da quantificação da expressão do gene *pxn* por PCR quantitativa.** CT: Grupo controle; HAC: Indivíduos HTLV-1+ assintomático e HAM: Indivíduos HTLV-1+ com TSP/HAM (PINTO, 2011).

Os eventos de polarização de membrana, na transmissão do vírus através do contato célula-célula, envolvem a atuação de uma série de proteínas que promovem a reorientação do centro organizador de microtúbulos (MTOC) (IGAKURA et al., 2003). A molécula de adesão Talina foi referida como participante ativa na junção célula-célula, formando placas ou agregados em conjugados de linfócitos T infectados pelo HTLV-1. Neste contexto, Igakura e colaboradores (2003) demonstraram que as proteínas Env e Gag, bem como a proteína do nucleocapsídeo (p15) acumulam no domínio livre central da Talina, nas junções entre as células, e que moléculas do RNA viral, juntamente com essas proteínas são transferidas da célula infectada para uma célula adjacente não infectada.

A estrutura primária de p12/p8 apresenta diferentes domínios que podem estar envolvidos na interação com receptores de superfície de membranas, proteínas de sinalização celular e do citoesqueleto e diversos estudos vêm sendo realizados, a fim de melhor compreender seu papel na infectividade e persistência viral (COLLINS et al, 1998; ALBRECHT et al., 2000; EDWARDS et al, 2002; FUKUMOTO et al., 2009; MALBEC et al., 2011), no entanto, até o momento, a interação destas proteínas virais com proteínas do esqueleto celular ainda foi elucidada.

Sabe-se que após clivagem proteolítica da precursora p12, o produto clivado, p8, direciona-se para a membrana celular, localizando-se nas balsas lipídicas. Os mecanismos pelos quais p8 trafega do complexo de Golgi até a membrana, e que organelas estão responsáveis por essa função, ainda não foram descritos na literatura. Uma proteína que se acredita estar relacionada a esse processo é a Miosina-Va (Figura 20), uma classe de motor celular que exerce diversas funções na migração celular, fagocitose, citocinese, transporte de organelas, polarização celular e tráfego de membrana (TITUS, 1997; RECK-PETERSON et al., 1999; BERG et al., 2001).



**Figura 20. Miosina V.** Esquema hipotético, evidenciando domínios estruturais (esquerda). Microscopia Eletrônica (direita).(BORGES, 2012)

A Miosina-Va está contida numa superfamília de motores celulares que geram movimento ao longo dos filamentos de actina de maneira ATP-dependente (TITUS, 1997). Esta proteína tem sido intimamente associada às etapas finais do processo de exocitose e é conhecida por promover a captura dos grânulos de pigmentos nos filamentos de actina em melanócitos (BOND et al., 2011). Mutações no gene da Miosina-Va causam a Síndrome de Grisceli, uma doença autossômica recessiva rara, caracterizada pela diluição dos pigmentos da pele e cabelo, devido ao acúmulo dos melanossomos na região perinuclear dos melanócitos e consequente deficiência no seu tráfego para os queratinócitos (CHOCIAY, 2003; VAN GELE et al., 2009).

## 2 JUSTIFICATIVA

Pela análise das estruturas primárias de p12/p8 e da Paxilina, hipotetiza-se que não há interação física entre elas, entretanto a presença de regiões ricas em prolina em ambas as proteínas, e pelo fato da Paxilina ser um dos componentes das adesões focais, sugere que elas participem do complexo de polarização do citoesqueleto no momento do contato e transmissão do HTLV-1 célula-célula. Como a Paxilina está mais expressa em indivíduos TSP/HAM, é possível que a expressão da proteína Tax, transativador viral, interfira na expressão de Paxilina. Assim o estudo inicial da possível interação entre essas proteínas é importante para melhor compreensão da significância do aumento de expressão da Paxilina em indivíduos com TSP/HAM.

Por outro lado, acredita-se que a Miosina-Va esteja envolvida no tráfego de p8 partindo de Golgi até a membrana plasmática. Considerando que p8 exerce importante função na transmissibilidade viral, participando ativamente da sinapse virológica e da formação dos conduítes celulares, o estudo das interações proteicas que contemplam o mecanismo de transporte desta proteína, desde sua formação até seu sítio de atuação, pode estabelecer um ponto inicial para a elucidação desta via, além de sugerir possíveis alvos terapêuticos para redução da infectividade, e transmissibilidade viral, e conseqüentemente, um controle da disseminação do vírus nos indivíduos infectados.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a interação entre os produtos das ORFs I e IV do HTLV-1 com as proteínas Miosina-Va e Paxilina, respectivamente.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão de Paxilina em células de linhagem transfectadas com construção plasmideal que expressa o gene *tax* do HTLV-1;
- Localizar as proteínas Tax e Paxilina em células de linhagem transfectadas com construção plasmideal que expressa o gene *tax* do HTLV-1;
- Sub-localizar a proteína p12 e seu produto clivado p8 em células de linhagem transfectadas com construções plasmideais que expressam diferentes variantes da ORF-I do HTLV-1;
- Colocalizar as proteínas p12/p8 e Miosina-Va em células de linhagem transfectadas com construções plasmideais que expressam diferentes variantes da ORF-I do HTLV-1.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 INFLUÊNCIA DE TAX NA EXPRESSÃO DE PAXILINA

#### 4.1.1 *Descrição das construções plasmideais pcTax e 18x21-EGFP*

As construções plasmideais utilizadas nesses ensaios foram cedidas pelo grupo de pesquisa coordenado pela Dra. Genoveffa Franchini (Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institute of Health – USA). A construção pcTax (Figura 21) foi utilizada para expressar a proteína Tax, enquanto a construção 18X21-EGFP (Figura 22) foi utilizada como controle da eficiência de transfecção, uma vez que possui o gene da GFP sob o comando da sequência LTR 5' do HTLV-1, que é transativada por Tax.



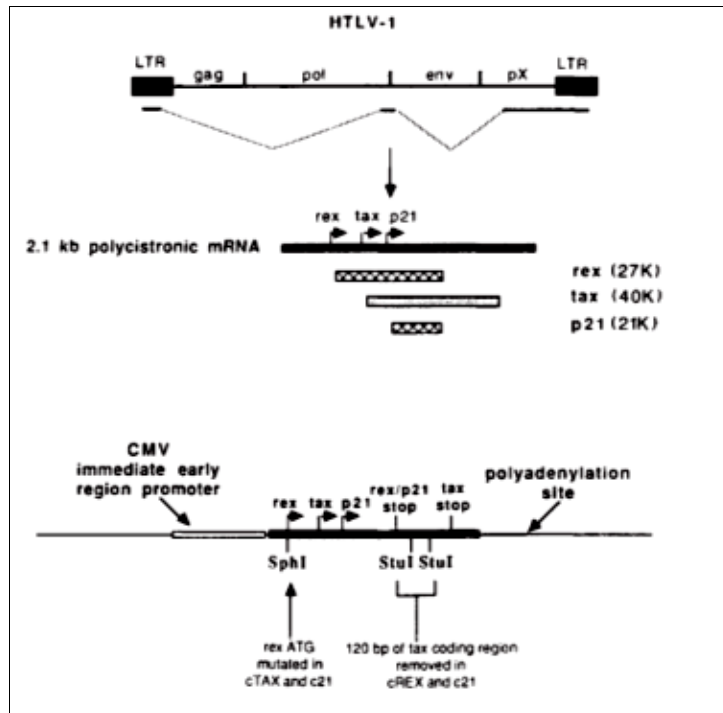


Figura 21. Mapa da construção pcTax. (RIMSKY et al., 1988)

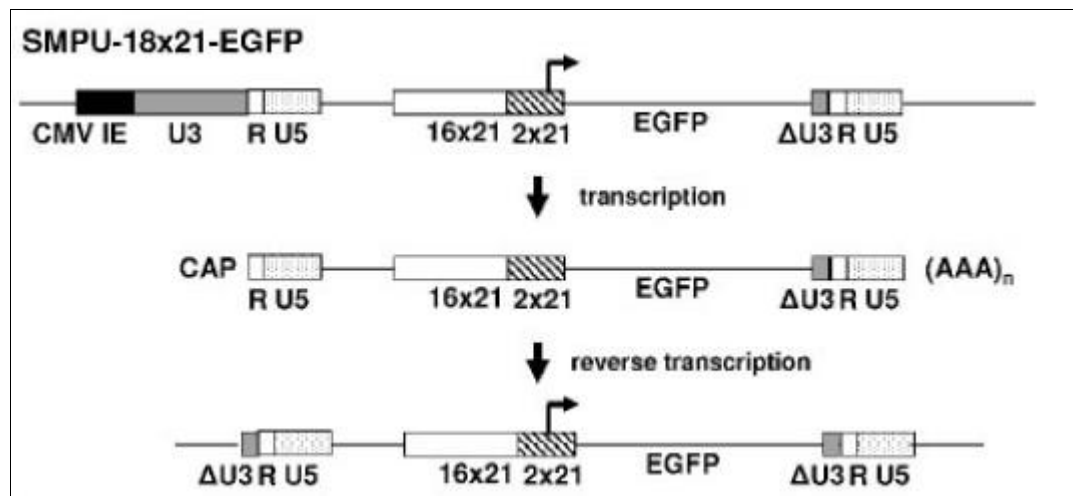


Figura 22. Mapa da construção 18x21-EGFP. (ZHANG et al., 2006)

#### 4.1.2 *Desenho Experimental*

Para verificar a influência de Tax sobre a expressão da proteína Paxilina, células de linhagem foram transfectadas com construções plasmídeais que expressam a proteína Tax e a expressão de Paxilina foi avaliada por *Western Blot* e microscopia confocal.

Inicialmente, objetivando confirmar a expressão dos plasmídeos e verificar a eficiência de transfecção, foi realizado um ensaio teste onde as células foram transfectadas com os plasmídeos pcTax e LTR-GFP e avaliadas por citometria de fluxo quanto ao percentual e intensidade de fluorescência (Figura 23). O número de eventos positivos para a proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein* - GFP) permitiu calcular o percentual de células efetivamente transfectadas e a intensidade de fluorescência confirmou a expressão de Tax.

## Teste de Eficiência da Transfecção por *Lipofectamine 2000*

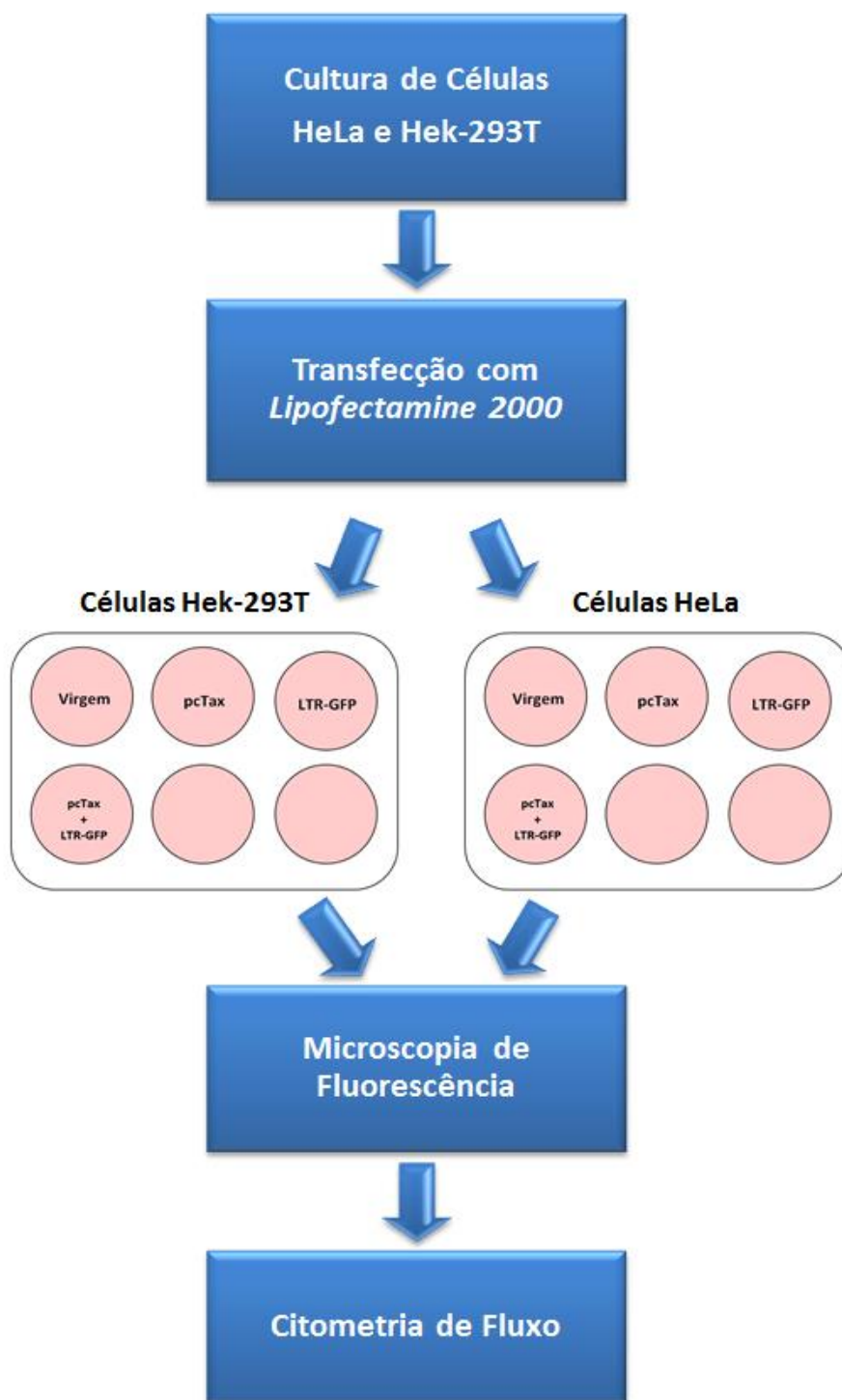


Figura 23. Desenho experimental para o teste de eficiência da transfecção por *Lipofectamine 2000*.

Após o teste de eficiência, células novamente transfectadas com pcTax e células não transfectadas (controle) foram utilizadas para realização de Western Blot e microscopia confocal. Em ambos os ensaios, anticorpo contra a Paxilina foi utilizado para detecção desta proteína (Figura 24).

### Verificação da Influência de Tax sobre a expressão de Paxilina

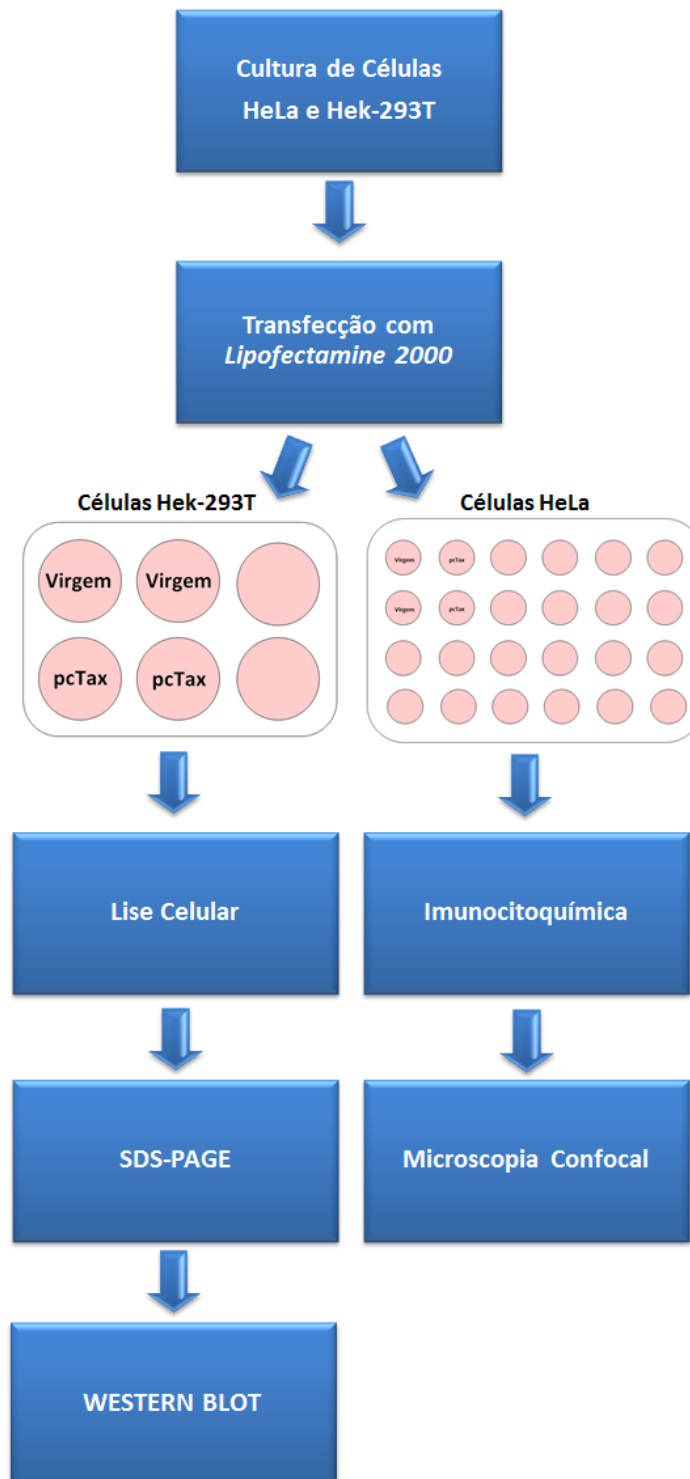


Figura 24. Desenho experimental para verificação da influência de Tax sobre a expressão de Paxilina.

#### 4.1.3 *Cultura de células*

Células HeLa e Hek-293T foram utilizadas nos ensaios. As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e penicilina-estreptomicina 1mM. As células cresceram em placas de cultura de 100 (60mm) ou frascos T75, em estufa sob condições controladas de temperatura (37°C), concentração de CO<sub>2</sub> (5%) e umidade (80%). O meio de cultura foi trocado a cada dois dias, ou quando necessário, antes desse período. O protocolo para troca do meio consistiu em retirar o meio de cultura, lavar as células duas vezes com PBS 1X e adicionar novamente volume adequado de meio DMEM. Para remoção das células aderentes, quando a troca de recipiente de cultura era necessária, prosseguiu-se com as etapas iniciais da troca de meio e após as duas lavagens com PBS 1X, adicionou-se tripsina-EDTA 1X e incubou-se a placa ou frasco T75 a 37°C por 4 minutos, seguido da inativação da tripsina pela adição, de pelo menos duas vezes o seu volume, de meio de cultura suplementado; após tripsinização, todo o volume foi centrifugado a 1000rpm por 4 minutos, o sobrenadante foi então descartado e o pellet contendo as células foi ressuspenso em meio DMEM suplementado e transferido para novo recipiente de cultura.

#### 4.1.4 *Transfecção de DNA*

Os ensaios de transfecção de DNA foram realizados utilizando o agente *Lipofectamine 2000* (Invitrogen), conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

Para os ensaios de imunocitoquímica, as células foram distribuídas sobre lamínulas Ø13mm, em placas de 24 poços à concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço; para os ensaios de *Western Blot* e/ou citometria de fluxo, as células foram distribuídas diretamente sobre placas de 6 poços, à concentração de  $5 \times 10^5$  células/poço; ambas as placas foram incubadas por 24h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 80% umidade. Após o período de incubação, 2µg e 5µg de cada variante de DNA plasmideal foram transfectados por poço para as placas de 24 e 6 poços, respectivamente, sendo as células novamente incubadas por 48h, quando então, foram coletadas para os ensaios de citometria de fluxo; imunocitoquímica, seguido de análise por microscopia confocal; ou eletroforese em SDS-PAGE, seguido de *Western Blot*.

#### 4.1.5 *Citometria de Fluxo*

Os ensaios de citometria de fluxo foram realizados para testar a eficiência de transfecção do agente *Lipofectamine 2000* e a expressão plasmideal. Após a incubação de 48h, as células foram tripsinizadas e lavadas duas vezes com PBS 1X por centrifugação a 1000rpm por 4 minutos cada. Em seguida as células foram diretamente adquiridas em citômetro FACSCalibur BD®.

#### 4.1.6 *Imunocitoquímica para proteína Paxilina*

Ensaio de imunocitoquímica foi realizado para marcação intracelular da proteína Paxilina. O protocolo consistiu nos seguintes passos: as células foram fixadas a

37°C com solução de paraformaldeído 4% (pH7.4) durante 15 minutos, em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS 1X (5 minutos cada), permeabilizadas com Triton-X100 0,3% e lavadas novamente uma única vez com PBS 1X (5 minutos). Após, aldeídos livres foram bloqueados com glicina 100mM e as células lavadas três vezes com PBS 1X (5 minutos cada). Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de BSA 2% por 2 horas, seguido de incubação com anticorpo primário (mouse  $\alpha$ -HU Paxillin) (Invitrogen) diluído em solução de BSA 2% por 1 hora. As células foram lavadas três vezes com PBS 1X (5 minutos cada) e incubadas com anticorpo secundário ( $\alpha$  mouse alexa 546) (Life Technologies) diluído em solução de BSA 2% por 1 hora. Em seguida as células foram lavadas cinco vezes com PBS 1X (5 minutos cada) e as lâminas foram montadas utilizando 6 $\mu$ L de meio de montagem Fluormount contendo DAPI (marcador para núcleo).

#### *4.1.7 Microscopia Confocal*

As lâminas marcadas por imunocitoquímica foram escaneadas em Microscópio Confocal Zeiss LSM 780, do Centro de Hemoterapia de Ribeirão Preto (HEMOCENTRO-RP). As imagens foram adquiridas utilizando os mesmos parâmetros, configurados a partir de células não transfectadas (controle negativo), também marcadas com os anticorpos primário e secundário por imunocitoquímica, para reduzir o sinal de fluorescência emitido por marcações inespecíficas do anticorpo (*background*).



#### 4.1.8 Western Blot

Para a realização de *Western Blot*, as células foram lisadas mecanicamente, com auxílio de *cell scraper*, em tampão RIPA (Sigma) a 4°C contendo inibidores de fosfatase e protease. Em seguida foi adicionado tampão de amostra (Tris-HCl 240mM, pH 6,8; SDS 0,8%;  $\beta$ -mercaptoetanol 200mM; Glicerol 40%; Azul de Bromofenol 0,02%) e o lisado foi aplicado em gel de Bis-Acrilamida 12%. Após a eletroforese, as bandas do gel foram transferidas para membrana de nitrocelulose em tampão de transferência sem álcool. A membrana foi, então, corada com solução de Ponceau, para checar a transferência, e lavada três vezes (5 minutos cada) em solução de TBS-TWEEN 20 0.05%. Os sítios inespecíficos foram bloqueados em solução de leite desnatado 5% em TBS-TWEEN 20 0.05% *overnight* a 4°C e no dia seguinte, a membrana foi incubada em solução de anticorpo primário 2 $\mu$ g/mL (mab mouse  $\alpha$  HU Paxillin) (Invitrogen) por 1 hora em temperatura ambiente, seguida de três lavagens (5 minutos cada) em solução de TBS-TWEEN 20 0.05% e incubação com solução de anticorpo secundário 0,3 $\mu$ g/mL (goat  $\alpha$  mouse horseradish conjugated) (Life Technologies) por mais 1 hora em temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada três vezes, incubada na mistura de duas soluções reveladoras (Tris-HCl 1M, pH 8,5; Luminol 250mM; ácido p-cumarico 90mM) (Tris-HCl 1M, pH 8,5; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) e imediatamente analisadas por quimiluminescência através do software ImageQuant LAS 4000 GE®.

## 4.2 LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS PROTEÍNAS p12/p8 E MIOSINA-Va

### 4.2.1 Desenho experimental

Para verificar a localização das proteínas p12/p8 e miosina-Va ensaios de imunocitoquímica, seguidos de microscopia confocal foram realizados (Figura 25)

#### Localização de p12/p8 e colocalização com Miosina Va

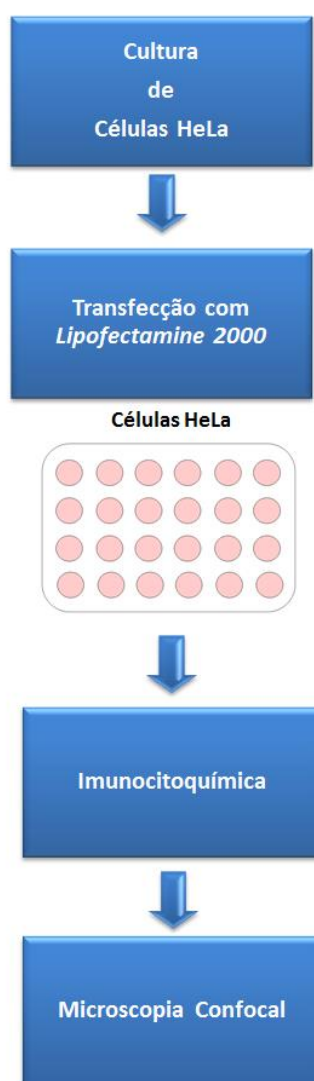


Figura 25. Desenho experimental para localização de p12/p8 e co-localização com Miosina-Va.

#### 4.2.2 Descrição das construções plasmídeais

As construções plasmídeais utilizadas nos ensaios para expressar a proteína p12, e seu produto clivado p8, foram cedidas pelo grupo de pesquisa coordenado pela doutora Genoveffa Franchini (Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institute of Health - USA). As variantes de p12/p8 utilizadas, correspondem às mutações encontradas em indivíduos infectados pelo HTLV-1, que apresentaram padrão diferenciado na expressão das formas clivada e não clivada desta proteína por Western Blot (Figura 26). Essas mutações foram então introduzidas, por mutação sítio dirigida, no vetor de expressão pME18SDSL-HAtag; com exceção da variante  $\Delta 29$ , que não correspondem à nenhuma mutação encontrada em pacientes e foi criada objetivando o estudo da forma totalmente clivada de p12, p8 (FUKUMOTO et al., 2007; FUKUMOTO et al., 2009).

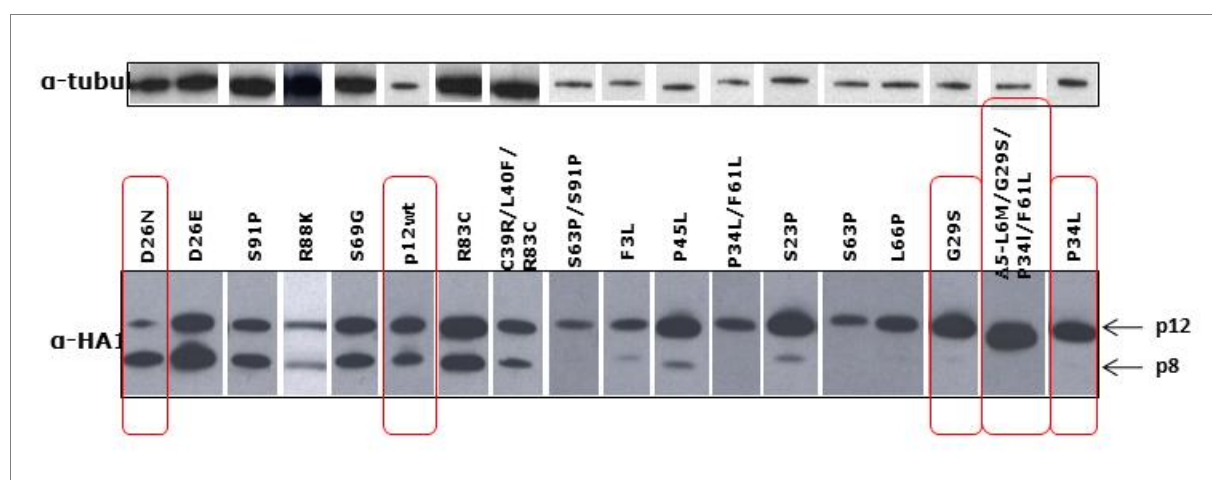


Figura 26. Padrão de expressão da proteína p12/p8 por WB.

Construções plasmideais para expressão de p12/p8 <sup>1</sup>	Características
pME-p12WT-HA	Expressa as proteínas p12 e p8 em concentrações aproximadamente iguais
pME-p12-P34L-HA	Expressa as proteínas p12 e p8 em concentrações aproximadamente iguais, porém mais elevadas que as concentrações do vetor pME-p12WT-HA
pME-p12- $\Delta$ 5-L6M/G29S/P34L/F61L-HA	Apresenta uma deleção dos cinco primeiros aminoácidos além de mudança do aminoácido nas posições 6, 29 e 61, expressando quase que totalmente a proteína p12
pME-p12-D26N-HA	Expressa a proteína p8 em concentrações maiores que a proteína p12
pME- $\Delta$ 29-HA	Apresenta uma deleção dos 29 primeiros aminoácidos, expressando somente a proteína p8
pME-p12-G29S-HA	Apresenta mudança do aminoácido na posição 29, expressando quase que totalmente a proteína p12

**Tabela 1. Descrição das construções plasmideais que expressam a proteína p12/p8**

#### 4.2.3 *Cultura de células*

Os ensaios de localização da proteína p12/p8 foram realizados em células HeLa e Jurkat. Os protocolos utilizados para cultura das células já foi descrito na seção 4.1.3 deste trabalho com alteração do meio de cultura utilizado para as células Jurkat que foi RPMI.

#### 4.2.4 *Transfecção de DNA*

Os ensaios de transfecção de DNA foram realizados utilizando o agente *Lipofectamine 2000* (Invitrogen), conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Para os ensaios de imunocitoquímica, as células foram distribuídas sobre lamínulas  $\varnothing 13\text{mm}$ , em placas de 24 poços à concentração de  $1 \times 10^5$  células/poço as placas foram incubadas por 24h a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  e 80% umidade. Após o período de incubação, 2 $\mu\text{g}$  de cada variante de DNA plasmídeo foram transfectados por poço, sendo as células novamente incubadas por 48h, quando então, foi realizado ensaio de imunocitoquímica, seguido de análise por microscopia confocal.

#### 4.2.5 *Imunocitoquímica para proteína p12/p8*

Ensaio de imunocitoquímica foi realizado para marcação intracelular do antígeno-tag HA, presente na proteína expressa pelas construções. O protocolo consistiu

nos seguintes passos: as células foram fixadas a 37°C com solução de paraformaldeído 4% (pH7.4) durante 15 minutos, em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS 1X (5 minutos cada), permeabilizadas com Triton-X100 0,3% e lavadas novamente uma única vez com PBS 1X (5 minutos). Após, aldeídos livres foram bloqueados com glicina 100mM e as células lavadas três vezes com PBS 1X (5 minutos cada). Os sítios inespecíficos foram bloqueados com solução de BSA 2% por 2 horas, seguido de incubação com anticorpo primário (mouse  $\alpha$ -HA) (Roche) diluído em solução de BSA 2% por 1 hora. As células foram lavadas três vezes com PBS 1X (5 minutos cada) e incubadas com anticorpo secundário ( $\alpha$  mouse alexa 488) (Life Technologies) e rodamina-faloidina diluídos em solução de BSA 2% por 30 minutos. Em seguida as células foram lavadas cinco vezes com PBS 1X (5 minutos cada) e lâminas foram montadas utilizando 6 $\mu$ L de meio de montagem Fluormount contendo DAPI (marcador para núcleo).

#### *4.2.6 Microscopia Confocal*

As lâminas marcadas por imunocitoquímica foram escaneadas em Microscópio Confocal Zeiss LSM 780 (multifótons), do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP). As imagens foram adquiridas utilizando os mesmos parâmetros, configurados a partir de células não transfectadas (controle negativo), também marcadas com os anticorpos primário e secundário por imunocitoquímica, para

reduzir o sinal de fluorescência emitido por marcações inespecíficas do anticorpo (*background*).

#### 4.3 CO-LOCALIZAÇÃO DE P12/P8 COM A PORÇÃO “CAUDA MEDIAL” DA Miosina-Va

O desenho experimental e a metodologia utilizados para os ensaios de co-localização das proteínas p12/p8 e Miosina-Va foram os mesmos descritos na seção 4.2 deste trabalho, apenas com adição do anticorpo primário anti-cauda medial ( $\alpha$ -CM) para detecção da proteína Miosina-Va e do respectivo anticorpo secundário ( $\alpha$  rabbit alexa 660) no ensaio de imunocitoquímica.

#### 4.4 CO-TRANSFECCÃO COM DOMINANTE NEGATIVO DA Miosina-Va (MyoVaFTNeu-eGFP)

Ainda utilizando o desenho experimental e a metodologia para os ensaios de co-localização das proteínas p12/p8 e Miosina-Va descritos na seção 4.2 deste trabalho, células Jurkat, uma linhagem de linfócitos, foram co-transfectadas com as variantes de p12/p8 e com o plasmídeo MyoVa Full-Tail Neuronal e-GFP (MyoVaFTNeu-eGFP), que expressa a variante neuronal, não funcional da Miosina-Va (dominante negativo), a qual compete com a Miosina-Va putativa por seus ligantes intracelulares. A proteína expressa a partir de MyoVaFTNeu-eGFP é formada pela cauda completa da Miosina-Va, sem o domínio motor (cabeça),

domínio responsável por sua movimentação através dos filamentos de actina, conjugada com GFP.

Como as células Jurkat são células não aderentes, crescem em suspensão, para que fosse possível realizar a etapa de imunocitoquímica, lamínulas tratadas com poli-L-lisina foram utilizadas, na etapa anterior à fixação, para induzir a adesão destas células às mesmas.

Uma vez que a variante MyoVaFTNeu-eGFP expressa a proteína conjugada com GFP, não foi necessária a utilização de anticorpo contra a Miosina-Va para detectá-la. A detecção da proteína p12/p8, por sua vez, foi realizada como descrito na seção 4.2.



## 5 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho foram divididos em dois capítulos para sua melhor compreensão. O capítulo I aborda os resultados dos ensaios realizados para verificação a ação de Tax sobre a proteína Paxilina. Os resultados sobre a interação entre p12/p8 e Miosina-Va constam no capítulo II, que também serão abordados no manuscrito para publicação intitulado “*Role of myosin-Va on HTLV-1 p8<sup>l</sup> protein traffic to cell surface*” que está em fase elaboração.

### 5.1 CAPÍTULO I: INFLUÊNCIA DE TAX NA EXPRESSÃO DE PAXILINA

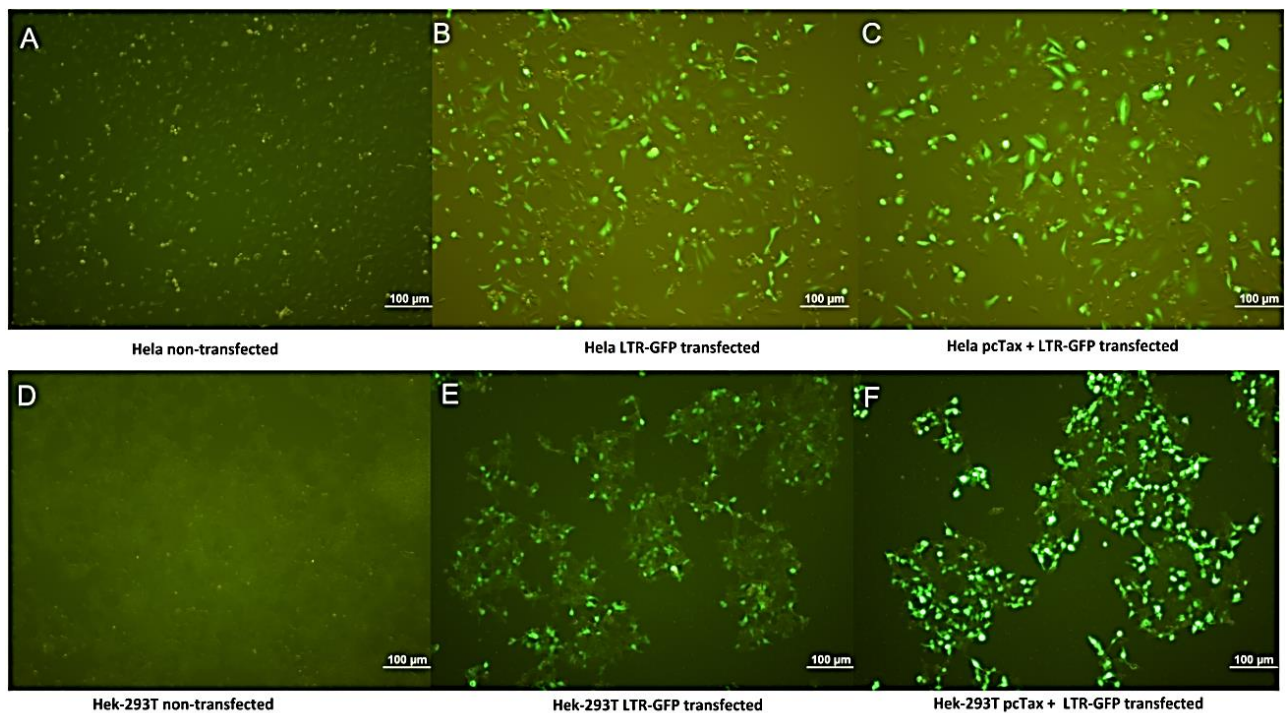
#### 5.1.1 *Teste de Eficiência das construções plasmideais*

O ensaio de microscopia de fluorescência após 48h de transfecção com as construções plasmideais pcTax e 18x21-EFG (LTR-GFP) demonstrou que a transfecção por *Lipofectamine 2000* foi eficiente em ambas as células (Figura 27). Visualmente, a cultura de células HeLa apresentaram maior percentual de células transfectadas, enquanto que as células Hek-293T apresentaram maior intensidade de fluorescência, o que foi confirmado no ensaio de citometria de fluxo (Figuras 28 e 29).

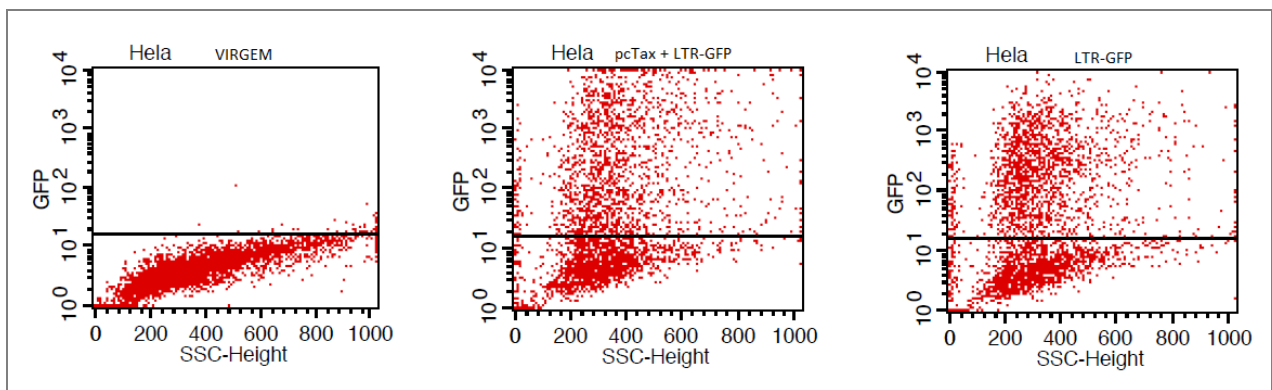
Verificou-se através de ensaio de citometria de fluxo, que as células co-transfectadas com pcTax e 18x21-EFG apresentaram intensidade de fluorescência de GFP, aproximadamente, duas vezes maior nas células HeLa e cerca de dez vezes maior nas células Hek-293T do que aquelas transfectadas apenas com a

construção 18x21-EFG, indicando a detecção indireta de Tax e sua influência na transativação da LTR com o conseqüentemente aumento na expressão da proteína GFP.

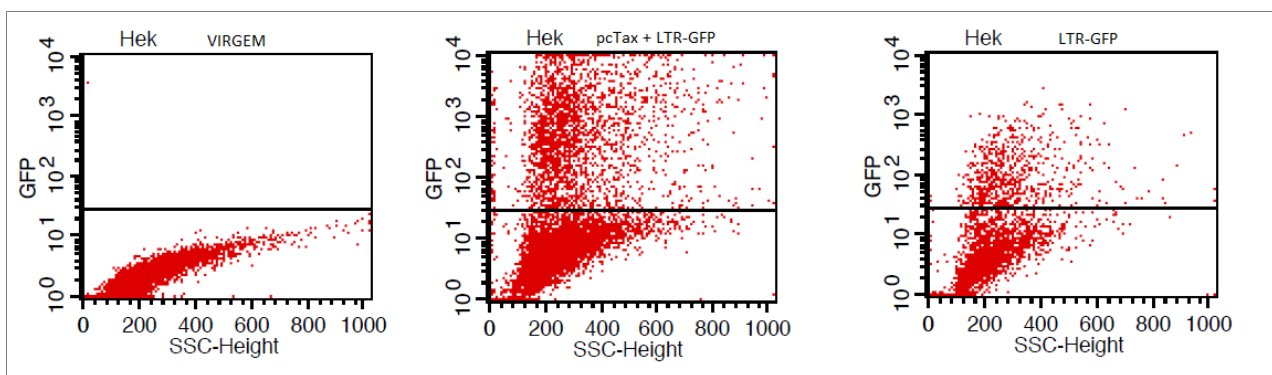
Através da aquisição por citometria de fluxo, foi possível também estimar o percentual de eficiência da transfecção por *Lipofectamine 2000*. No ensaio, 10.000 células foram adquiridas para cada linhagem e o percentual de células GFP<sup>+</sup> (HeLa LTR-GFP %gated = 51,62; HeLa pcTax + LTR-GFP %gated = 46,47; Hek-293T LTR-GFP %gated = 25,51; Hek-293T pcTax + LTR-GFP %gated = 28,64), pôde fornecer uma estimativa da eficiência de transfecção que variou em torno de 48% para as células HeLa e 27% para as células Hek-293T (Figura 30).



**Figura 27. Expressão de GFP pós-transfecção por microscopia de fluorescência.** Células HeLa: não transfectadas (A), transfectadas com LTR-GFP (B), co-transfectadas com pcTax e LTR-GFP (C). HEK-293T: não transfectadas (D), transfectadas com LTR-GFP (E), co-transfectadas com pcTax e LTR-GFP (F). Células HEK-293T apresentaram melhor expressão de Tax, como pode ser observado comparando-se E e F. F apresenta maior fluorescência devido à ação de Tax sobre a LTR.



**Figura 28. Expressão de GFP por citometria de fluxo pós-transfecção em células HeLa.**



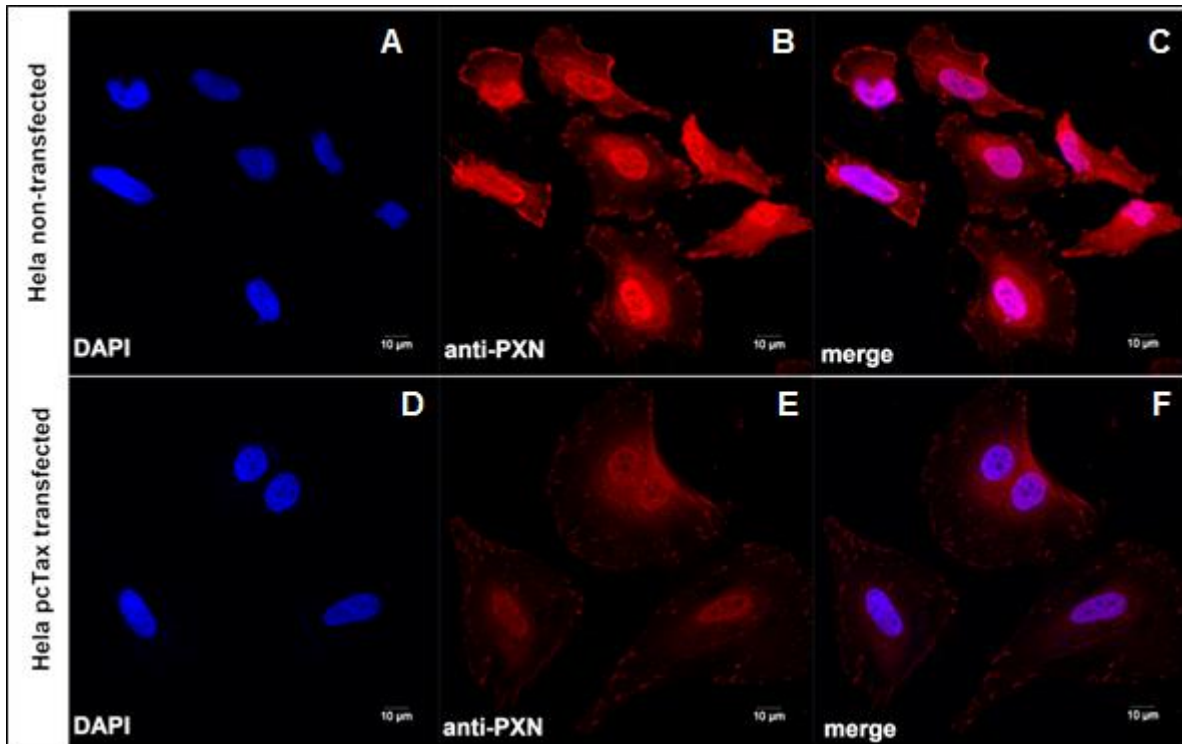
**Figura 29. Expressão de GFP por citometria de fluxo pós-transfecção em células HEK-293T.**

Vetor	HeLa (%Gated / Ymean)	Hek-293T (%Gated / Ymean)
Virgem	0.23 / 41.37	0.09 / 23.40
Virgem + Lipofectamina	0.32 / 26.79	0.03 / 1188.61
pcTax + LTR-GFP	46.47 / 1326.28	28.64 / 1513.52
LTR-GFP	51.62 / 577.79	25.51 / 153.39

**Figura 30. Percentual de expressão de GFP e intensidade de fluorescência por citometria de fluxo.** %Gated corresponde ao percentual de eventos num total de 10.000. Ymean corresponde à média de fluorescência das células adquiridas.

### 5.1.2 Verificação da influência de Tax sobre a expressão de Paxilina

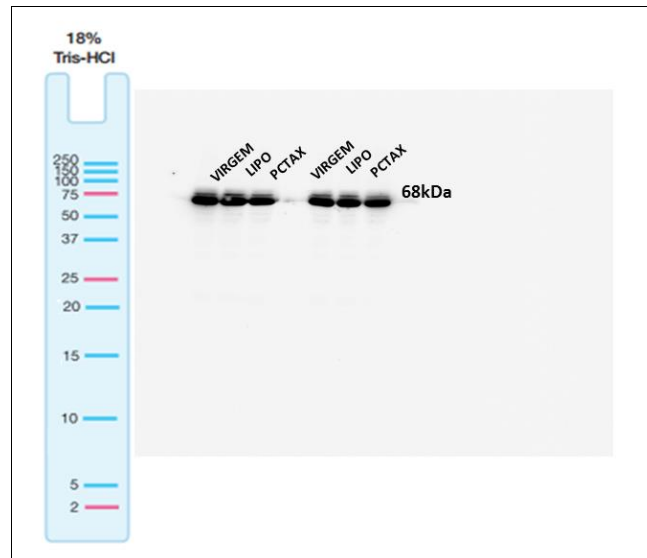
A partir dos resultados obtidos no teste de transfecção, seguiu-se a verificação da influência de Tax sobre a expressão da proteína Paxilina. Pelo ensaio de imunofluorescência, visualmente, a proteína Paxilina estava menos expressas nas células HeLa transfectadas com pcTax, quando comparadas com as não-transfectadas (controle) (Figura31). A Paxilina foi visualizada concentrada no núcleo e adesões focais em ambas as células transfectadas e não-transfectadas, porém a intensidade de fluorescência nas células controle foi maior que as células que expressavam Tax, sugerindo que esta proteína, interfere na expressão de Paxilina, diminuindo-a.



**Figura 31. Expressão de Paxilina por Imunofluorescência.** (A), (B) e (C) Células HeLa não-transfectadas. (A) DAPI: marcador de DNA. (B)  $\alpha$ -pxn (alexa 568) (C) Sobreposição de A e B. (D), (E) e (F) Células HeLa transfectadas com pcTax. (D) DAPI: marcador de DNA. (E)  $\alpha$ -pxn (alexa 568) (F) Sobreposição de D e E. As células transfectadas apresentam menor fluorescência do anticorpo anti-Paxilina, sugerindo menor expressão dessa proteína por ação da proteína Tax.

A fim de confirmar se a expressão de Paxilina diminui em células expressando Tax, células Hek-293T transfectadas com pcTax foram avaliadas por WB e a proteína Paxilina foi detectada. Não foi verificada diferença significativa na expressão de Paxilina quando células não transfectadas (virgem) e submetidas apenas ao agente de transfecção (lipo) foram comparadas com células transfectadas com pcTax, contrapondo o resultado obtido por imunofluorescência.

Estes ensaios estão sendo repetidos, uma vez que foi adquirido anticorpo contra a proteína Tax para melhor inferência sobre os resultados obtidos.

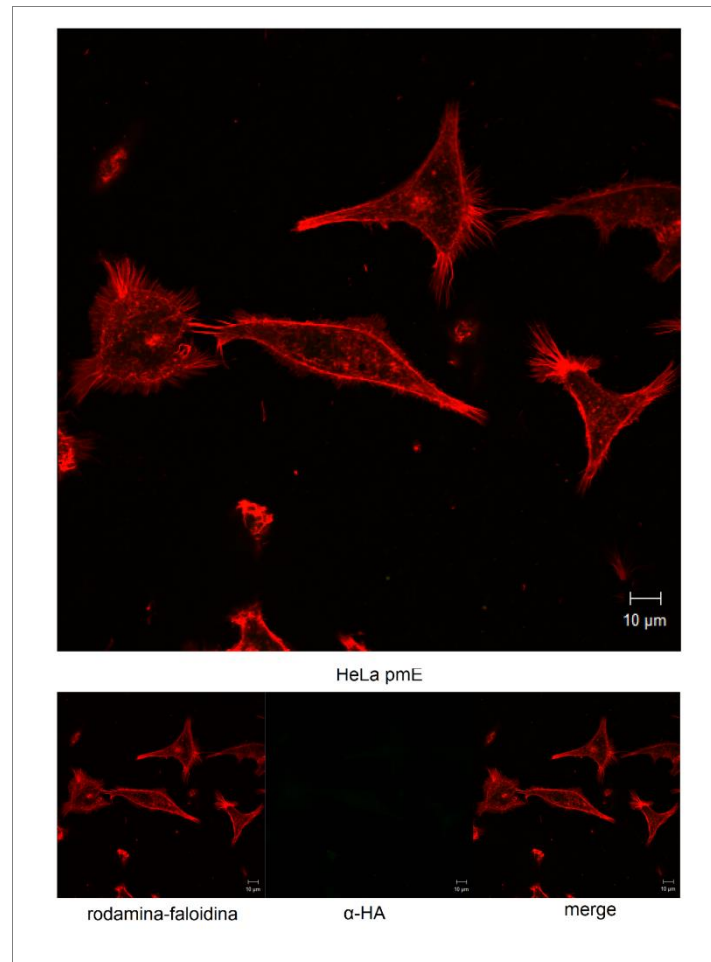


**Figura 32. Expressão de Paxilina por Western Blot.** Células HEK-293T – VIRGEM: não-transfectadas; LIPO: submetidas apenas ao agente de transfecção *Lipofectamine 2000*; PCTAX: transfectadas com a construção pcTax. Paxilina – 68kD

## 5.2 CAPÍTULO II: INTERAÇÃO ENTRE p12/p8 E MOSINA-Va

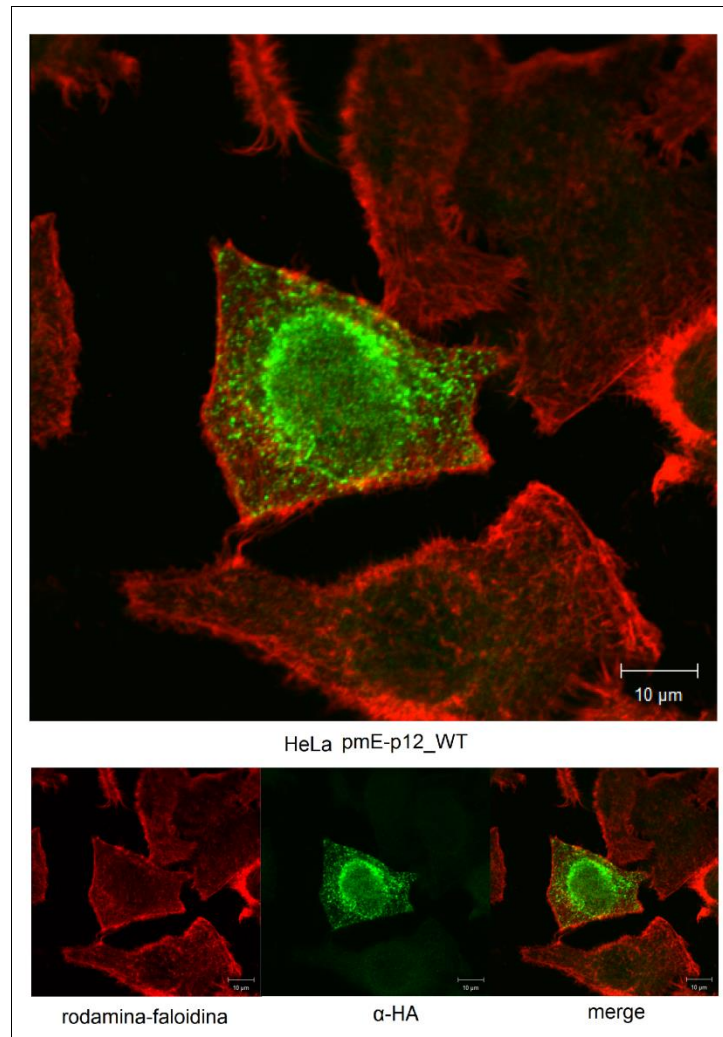
### 5.2.1 Localização Celular da Proteína p12/p8

A localização celular de p12/p8 em células HeLa, a partir das variantes que expressam as isoformas dessa proteína em diferentes concentrações, corroboraram com os dados já descritos na literatura (FUKUMOTO et al., 2009). A construção plasmideal pmE não contém a sequência codificante para a ORF-1 e o antígeno HA não foi detectado pelos ensaios de imunofluorescência (Figura 33).



**Figura 33. Imunofluorescência da construção pME (vetor vazio) – controle negativo.** Antígeno HA não detectado. Rodamina-faloidina, marcador de citoesqueleto de actina; α-HA, marcador de p12/p8; merge: sobreposição.

Já nos ensaios onde foi transfectada a construção pME-p12WT, que expressa a sequência selvagem da proteína, a presença do antígeno HA foi detectada, principalmente, na região perinuclear e concentrada em agregados, visualizados como pontos mais intensos dispersos no citoplasma e próximos à membrana celular (Figura 34).

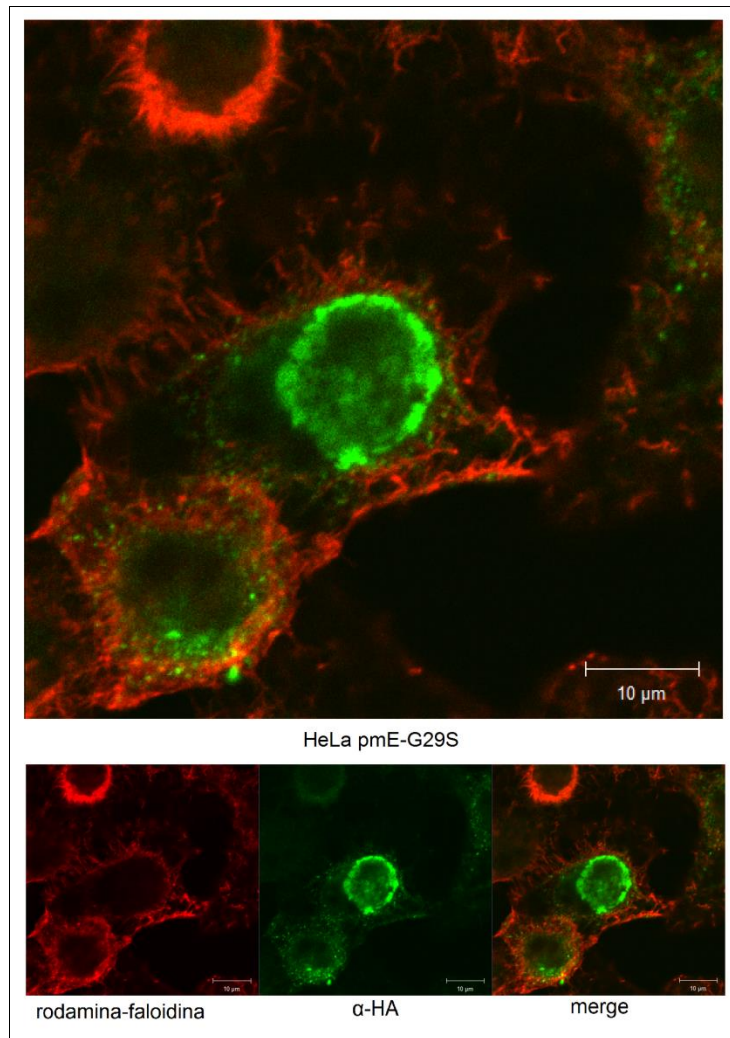


**Figura 34. Imunofluorescência da construção pME-p12\_WT (sequencia selvagem).** Rodamina-faloidina, marcador de citoesqueleto de actina;  $\alpha$ -HA, marcador de p12/p8; merge: sobreposição.

Nas células transfectadas com a variante que expressa predominantemente p12, pME-p12\_G29S, a presença do antígeno HA foi detectada quase que totalmente na região perinuclear, resinadindo, provavelmente, entre retículo endoplasmático e complexo de golgi, já que a mutação na posição 29 impede a segunda clivagem



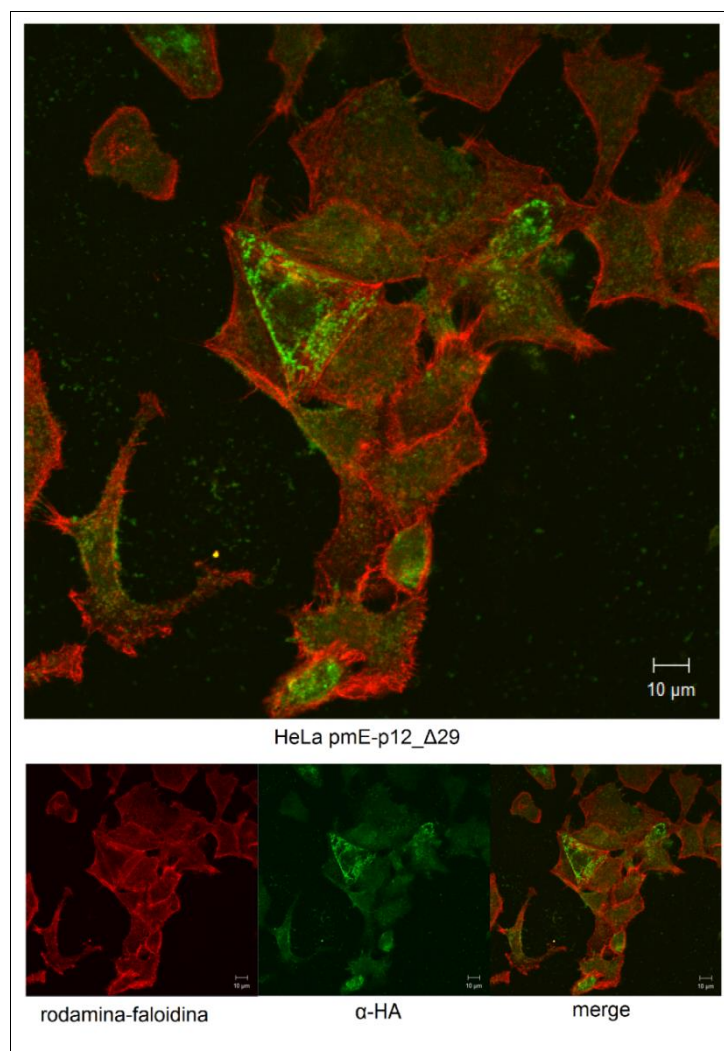
proteolítica da proteína p12, que ocorre em golgi, prevenindo a formação do produto clivado p8, residente de membrana.



**Figura 35. Imunofluorescência da construção pME-p12\_G29S.** Expressão predominante de p12, na região perinuclear. Rodamina-faloidina, marcador de citoesqueleto de actina; α-HA, marcador de p12/p8; merge: sobreposição.

A construção pmE-p12\_Δ29 apresenta a deleção dos 29 primeiros aminoácidos e expressa apenas a proteína p8, que após sintetizada é direcionada para a

membrana celular. Nos ensaios de imunofluorescência em células HeLa, a expressão dessa variante, detectou a presença do antígeno HA na membrana e em agregados puntiformes dispersos no citoplasma muito próximos à ela (Figura 36).

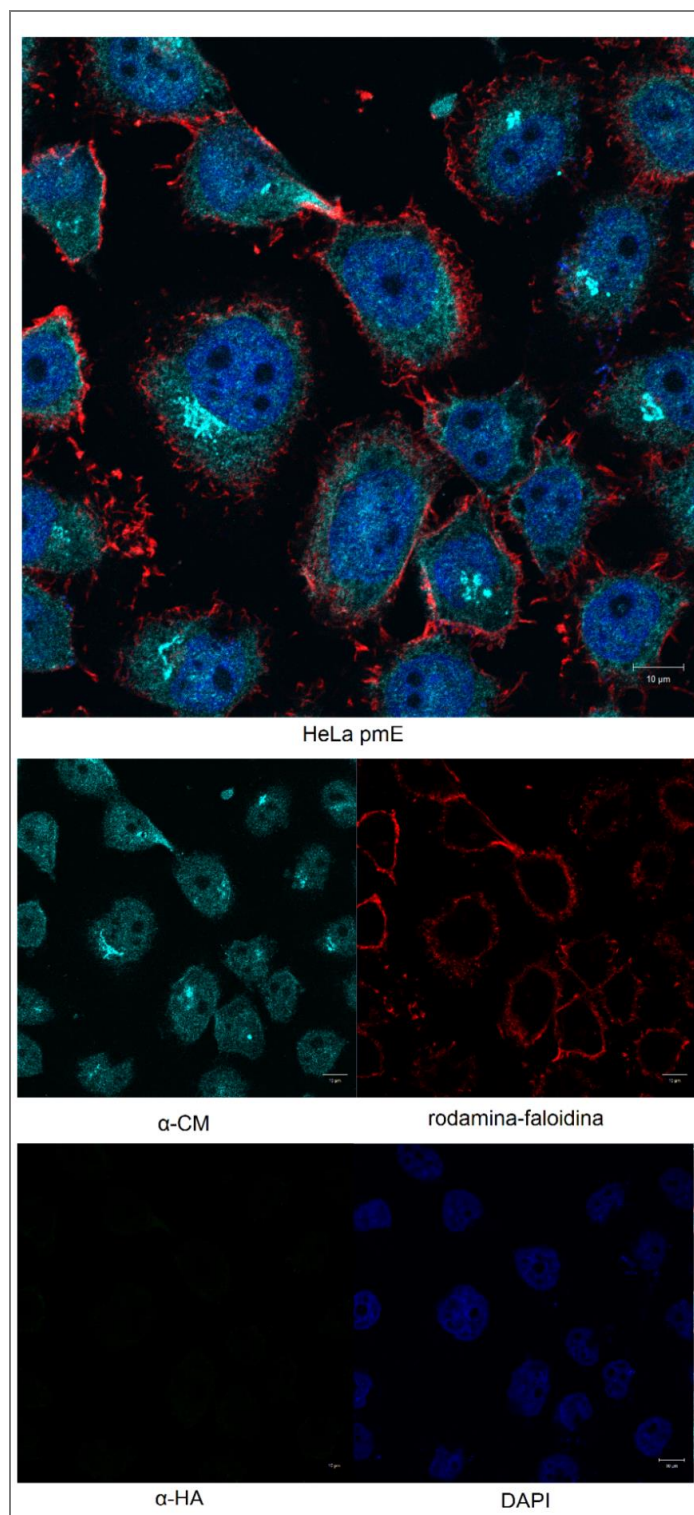


**Figura 36. Imunofluorescência da construção pME-p12\_Δ29.** Expressão predominante de p8, na membrana celular e em agregados no citoplasma muito próximos a ela. Rodamina-faloidina, marcador de citoesqueleto de actina; α-HA, marcador de p12/p8; merge: sobreposição.

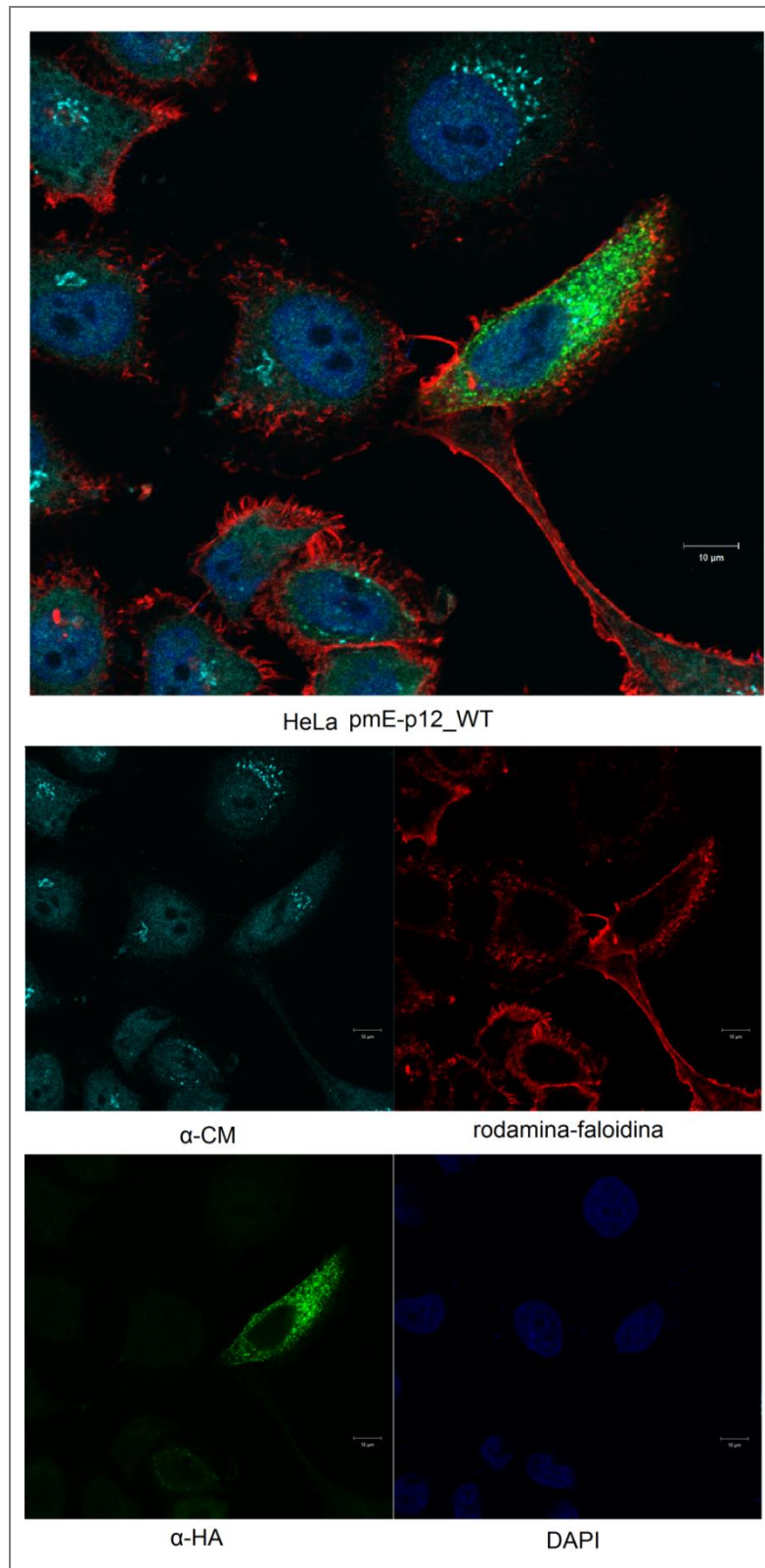
### 5.2.2 *Co-localização de p12/p8 e Cauda Medial da Miosina-Va*

Co-localização de p12/p8 e da cauda medial da Miosina-Va (Myo5CM) foi realizada em células HeLa e Jurkat, por imunofluorescência, a partir das variantes que expressam p12/p8 em diferentes concentrações. Nas células HeLa transfectadas com o vetor vazio pME o antígeno HA não foi detectado, como esperado (Figura 37), e a cauda medial da Miosina-Va foi observada na região perinuclear, provavelmente Golgi como descrito na literatura.

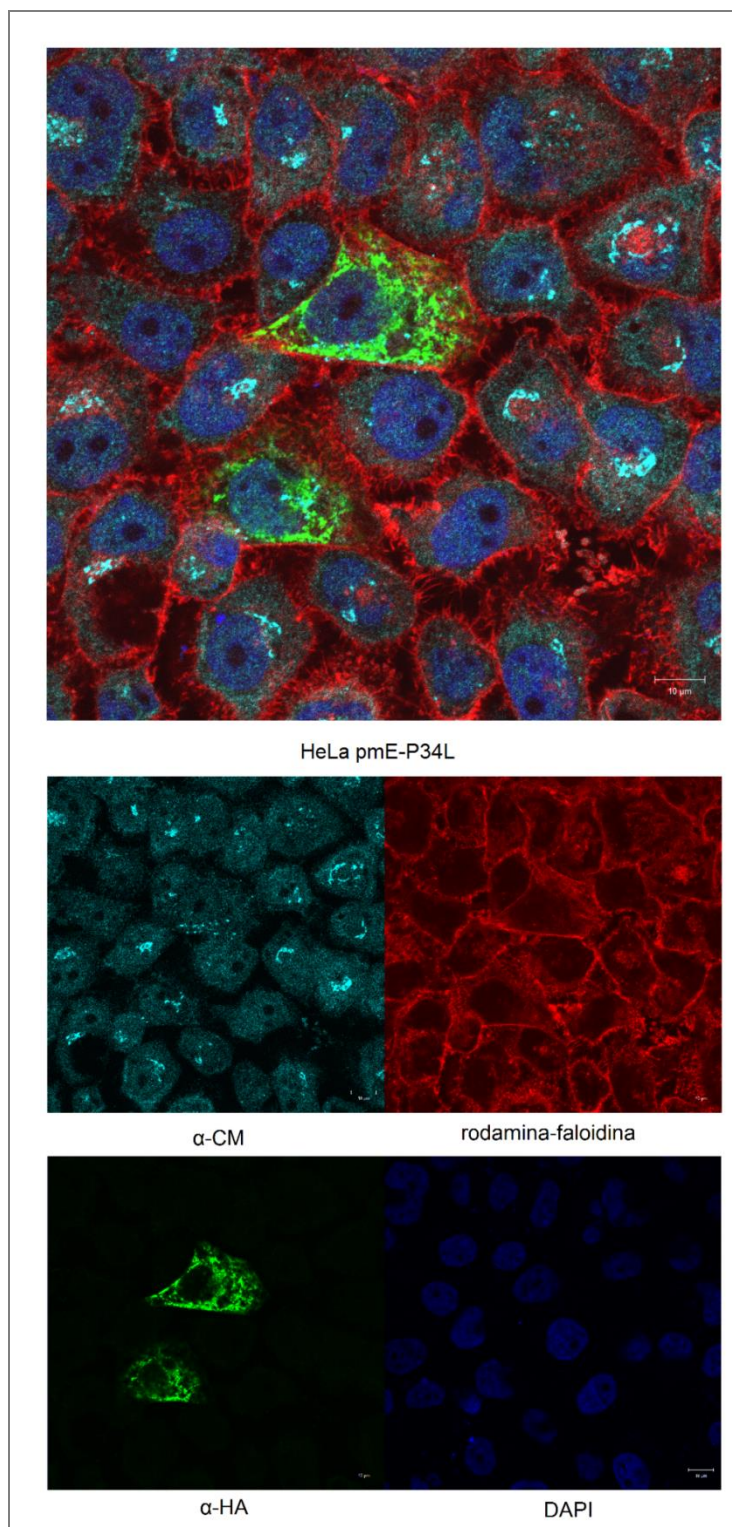
Observou-se, que nas células HeLa, p12/p8 e a cauda medial da Miosina-Va não colocalizam na região perinuclear, onde predomina a fração p12, residente do retículo e complexo de Golgi (variantes selvagem – pmE-p12WT e que expressa a isoforma p12 em maior concentração – pmE-p12\_P34L) (Figuras 38 e 39). Já nas células transfectadas com as variantes que expressam apenas (pmE-p12\_Δ29) ou predominantemente p8 (pmE-p12\_D26N) houve co-localização pontual dessa proteína com a cauda medial da Miosina-Va, em agregados citoplasmáticos visualizados como pontos mais espessos (Figuras 40 e 41 - setas).



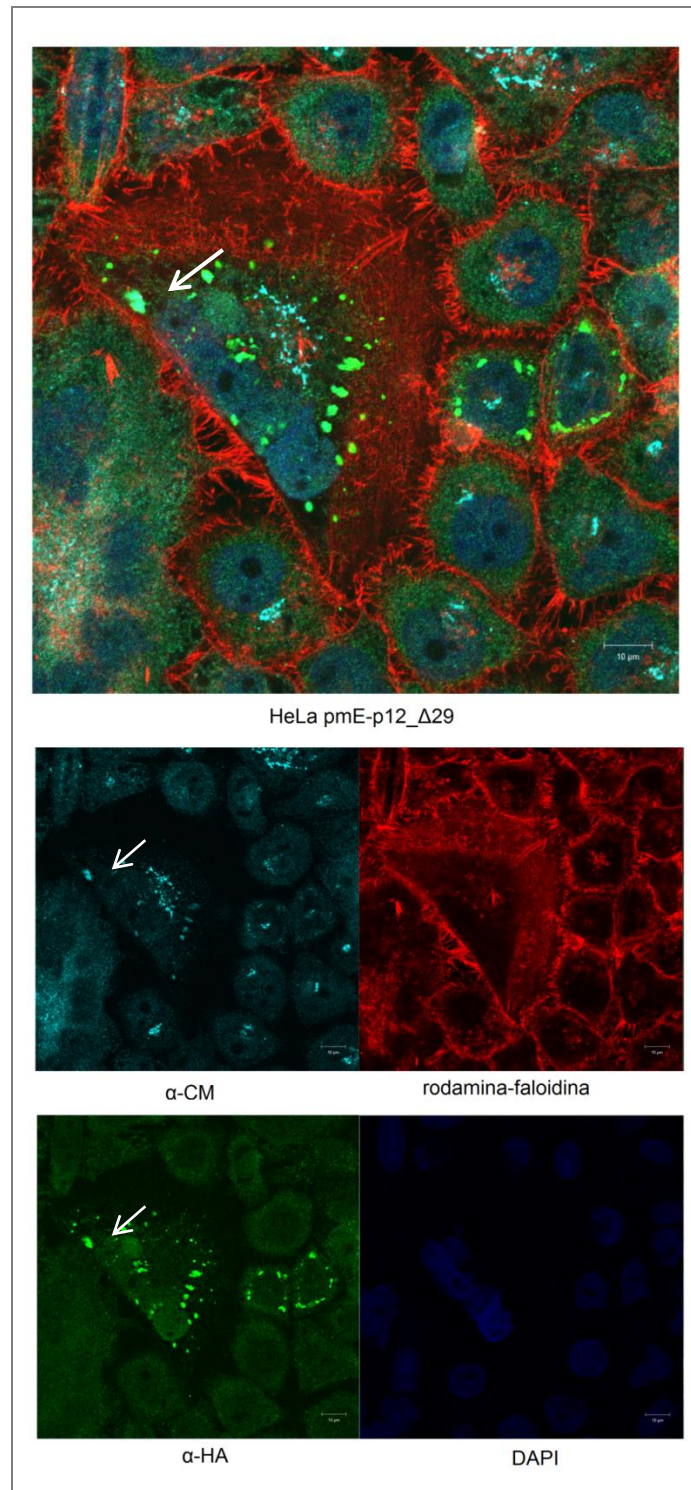
**Figura 37. Localização celular da cauda medial da Miosina-Va.** Células HeLa transfectadas com a construção pME, que não contém a sequência codificante para a ORF-1. Controle negativo para expressão de p12p8.



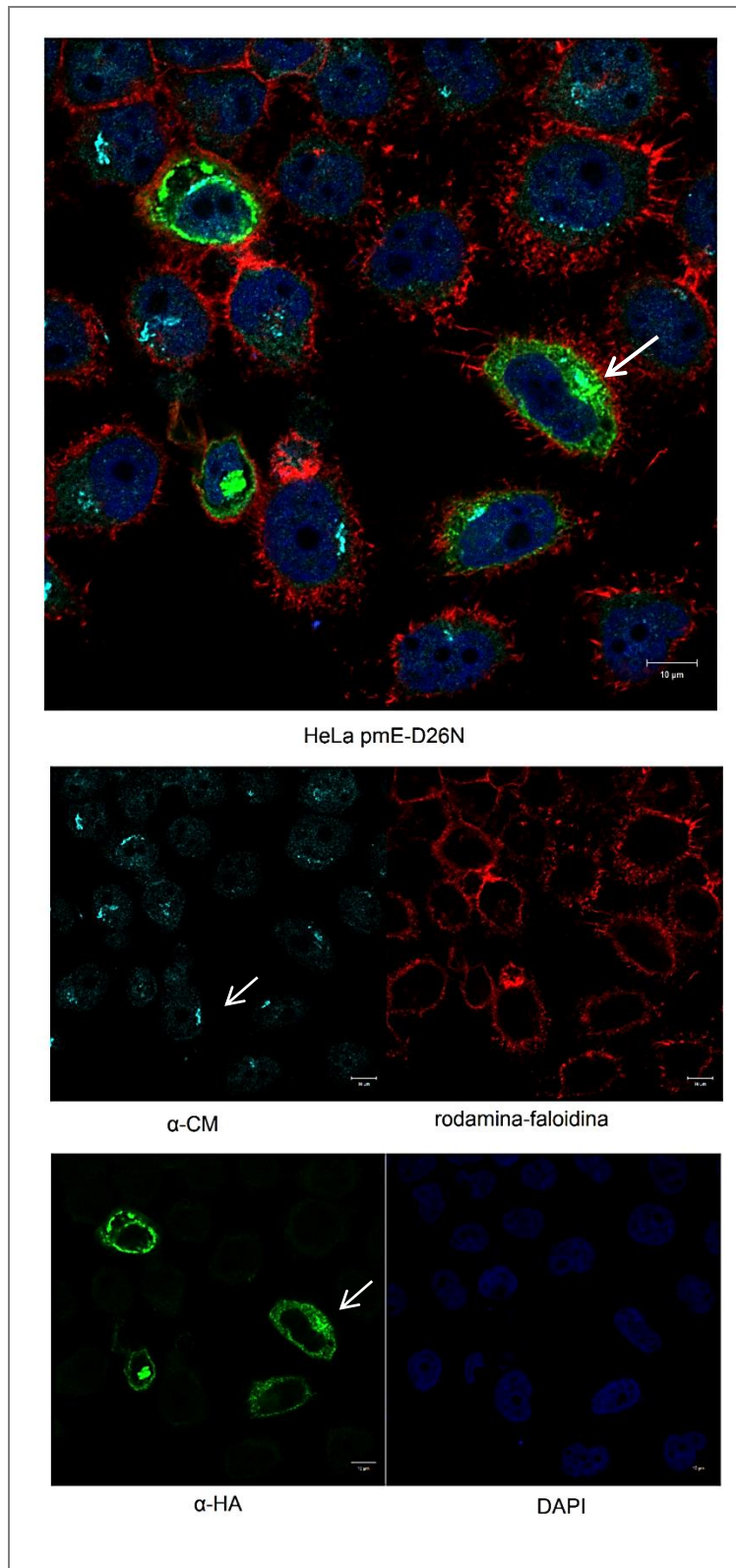
**Figura 38. Expressão de p12p8 e cauda medial da Miosina-Va.** Células HeLa transfectadas com a construção pME-p12\_WT (sequência selvagem de p12p8).



**Figura 39. Imunofluorescência para p12p8 e cauda medial da Miosina-Va.** Células HeLa transfetadas com a construção pME-p12\_P34L (expressa predominantemente p12).



**Figura 40. p12p8 e cauda medial da Miosina-Va colocalizam em agregados próximos à membrana.** Células HeLa transfetadas com a construção pME-p12\_Δ29 (expressa apenas p8).

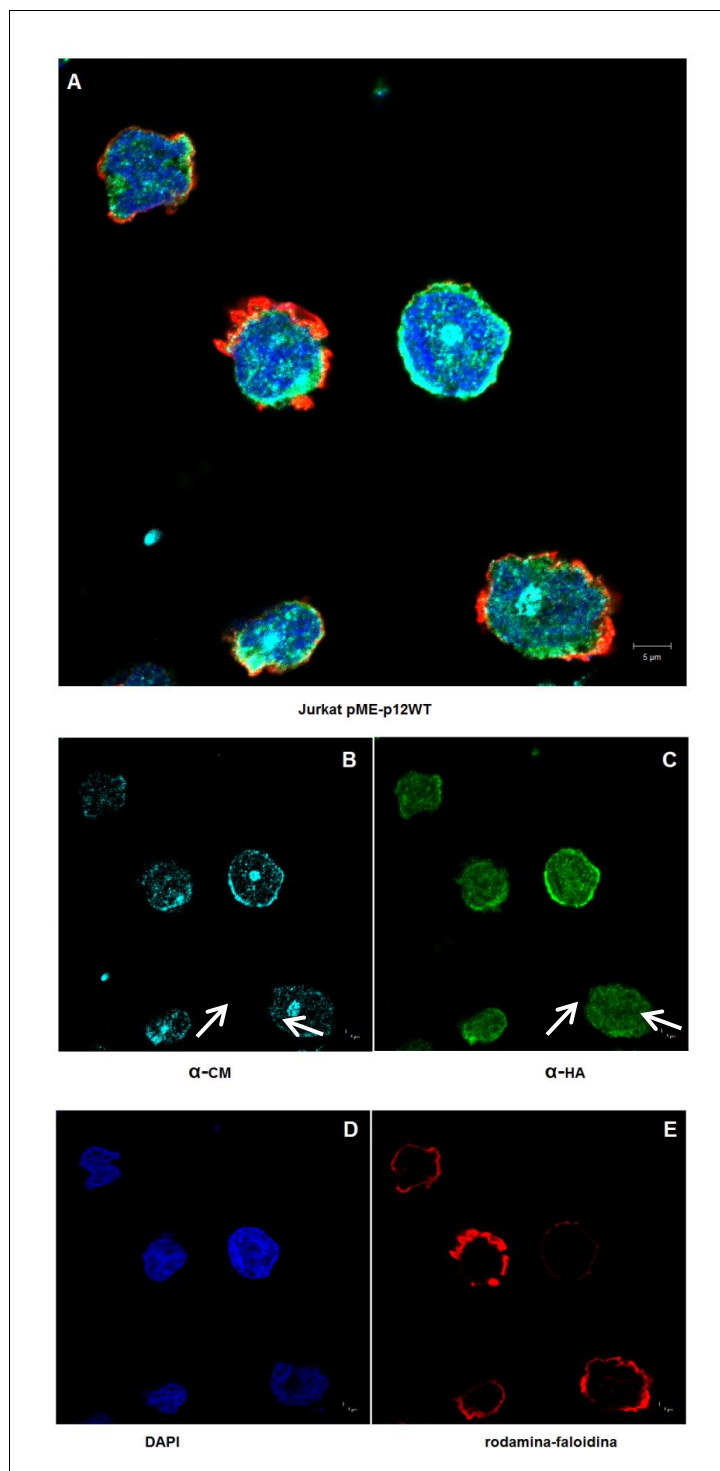


**Figura 41. Agregados citoplasmáticos de p8 e Miosina-Va.** Células HeLa transfectadas com a construção pME-p12\_D26N (expressa predominantemente p8).

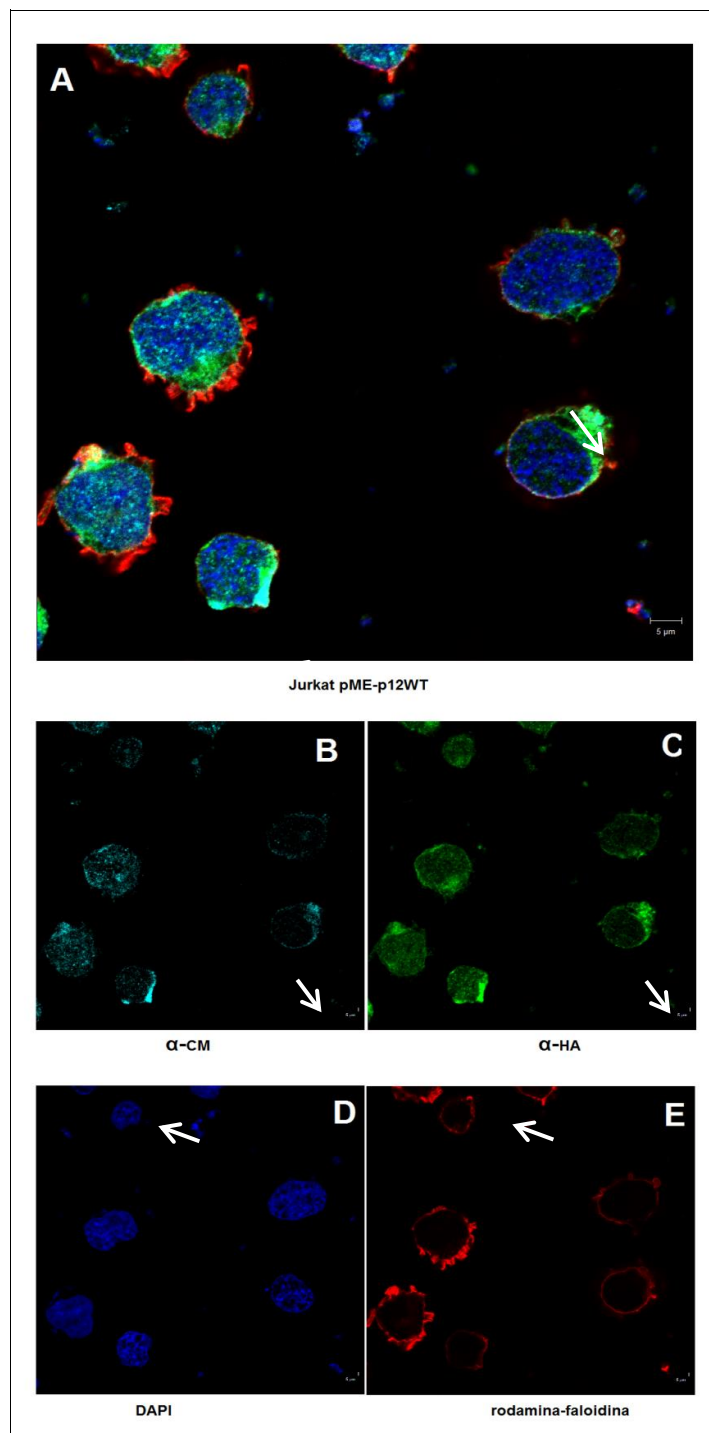


Nas células Jurkat, observou-se, co-localização de p12/p8 e cauda medial da Miosina-Va na membrana de células transfectadas com a variante selvagem – pmE-p12WT, que expressa a isoforma p12 em maior concentração – (Figuras 42 e 43, setas).

Também nas células transfectadas com as variantes que expressam apenas p8 (pmE-p12\_Δ29), houve co-localização dessas proteínas em agregados perimembranares espessos (Figura 44 - setas). Por outro lado nas células em que a isoforma p12 (pmE-p12\_G29S) está mais expressa a co-localização dessa proteína com a cauda medial da Miosina-Va pôde ser observada, além da membrana celular, como pontos dispersos no citoplasma. (Figura 45).

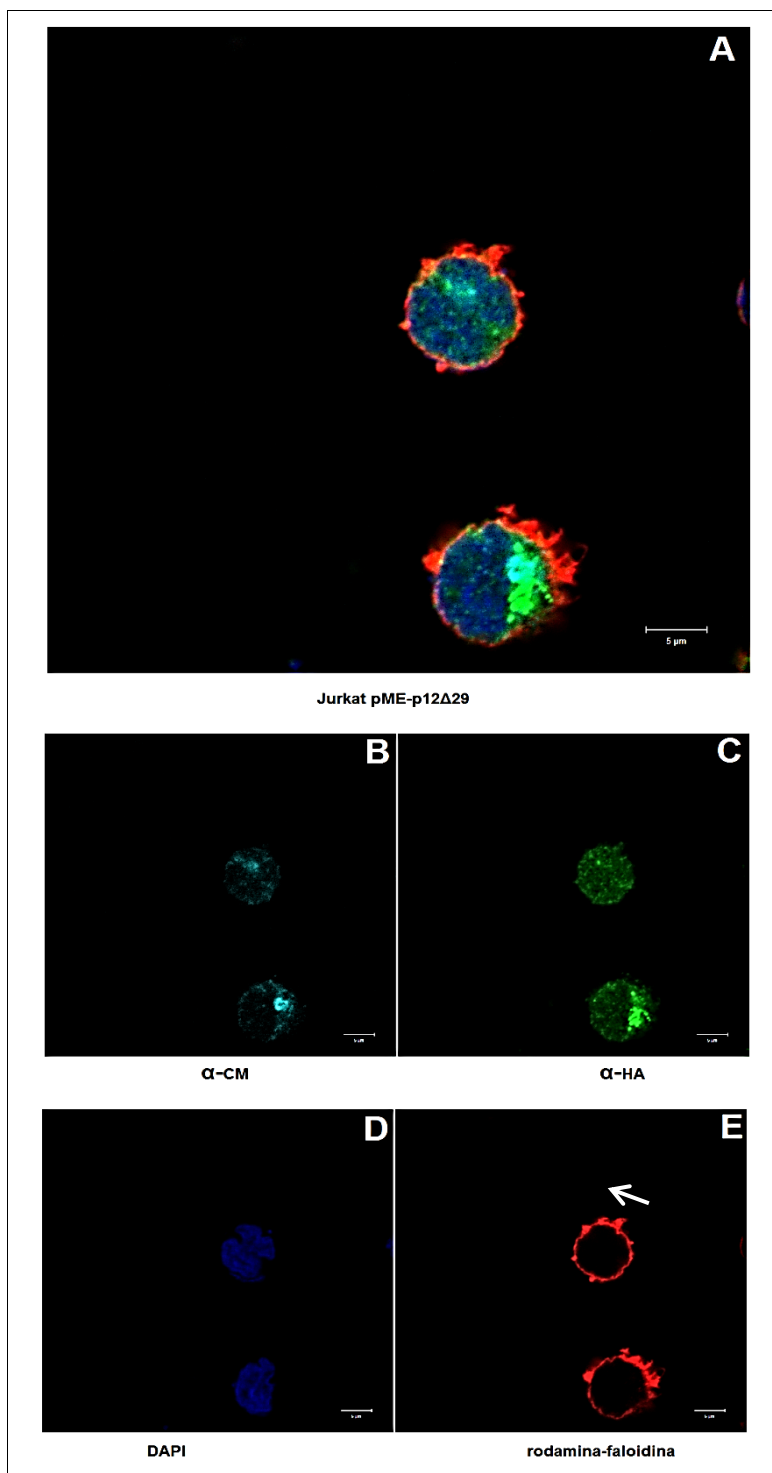


**Figura 42. Antígeno HA e  $\alpha$ -CM MyoVa co-localizam na membrana de linfócitos T (Jurkat) 1.** (A). Sobreposição (B).  $\alpha$ -CM: Cauda medial da Miosina-Va (alexa 660); (C). $\alpha$ -HA: Antígeno HA-p12p8 (FITC); (D). DAPI: marcador de DNA; (E). Rodamina-Faloidina: marcador de citoesqueleto de actina.

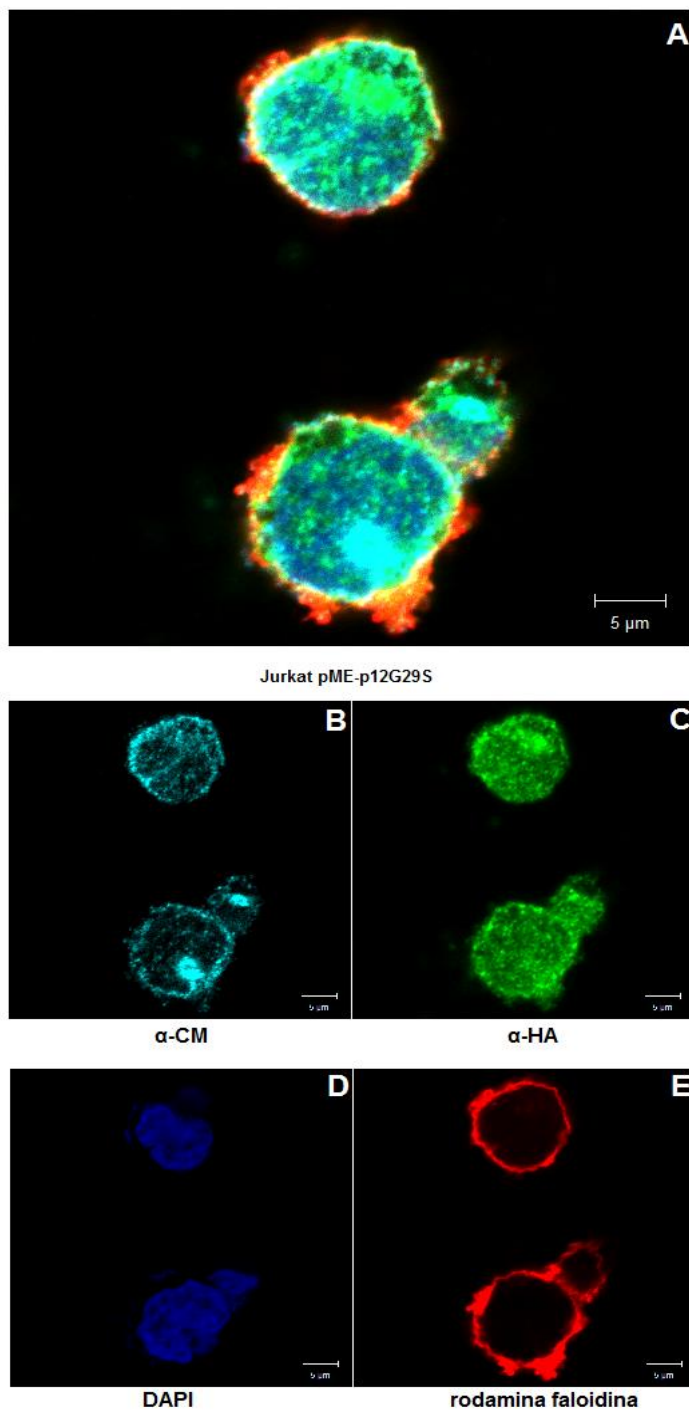


**Figura 43. Antígeno HA e  $\alpha$ -CM MyoVa co-localizam na membrana de linfócitos T (Jurkat) 2.**

**(A).** Sobreposição **(B).**  $\alpha$ -CM: Cauda medial da Miosina-Va (alexa 660); **(C).**  $\alpha$ -HA: Antígeno HA-p12p8 (FITC); **(D).** DAPI: marcador de DNA; **(E).** Rodamina-Faloidina: marcador de citoesqueleto de actina.



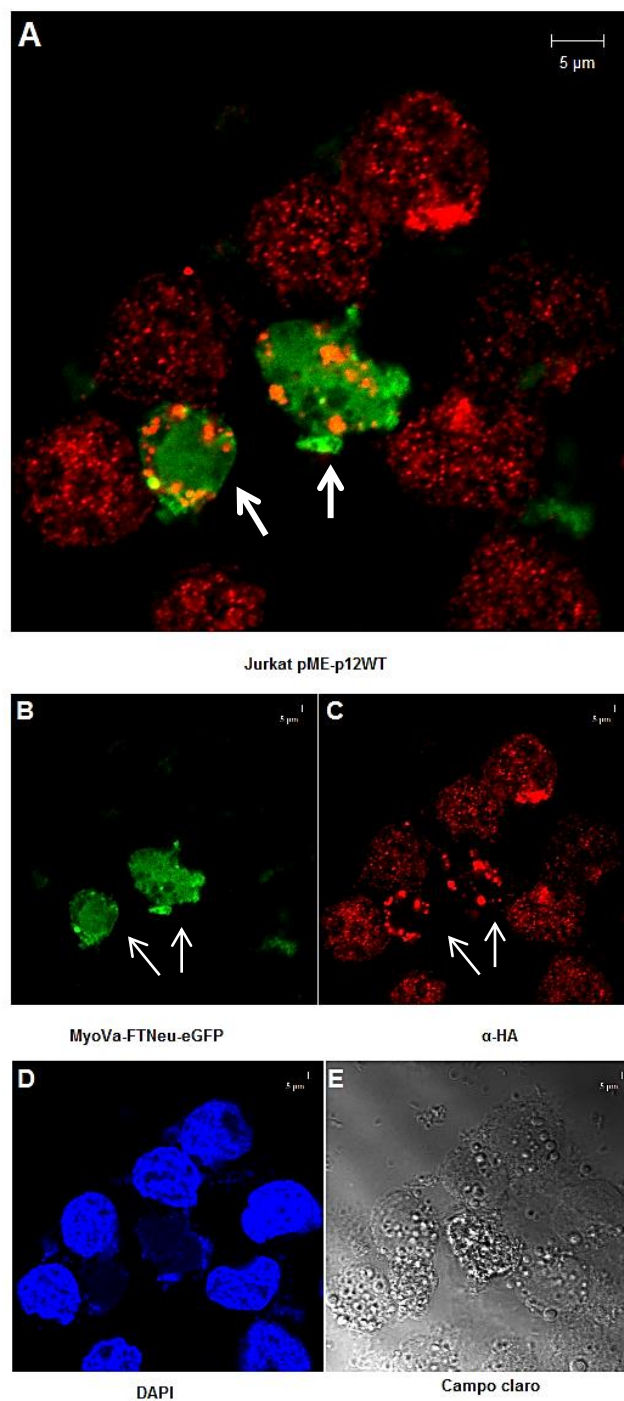
**Figura 44. p8 e cauda medial da Miosina-Va co-localizam em forma de agregados espessos na região perimembranar de linfócitos T (Jurkat). (A).** Sobreposição **(B).** α-CM: Cauda medial da Miosina-Va (alexa 660); **(C).** α-HA: Antígeno HA-p12p8 (FITC); **(D).** DAPI: marcador de DNA; **(E).** Rodamina-Faloidina: marcador de citoesqueleto de actina.



**Figura 45. p12 e cauda medial da Miosina-Va co-localizam em pontos dispersos no citoplasma de linfócitos T (Jurkat). (A).** Sobreposição **(B).** α-CM: Cauda medial da Miosina-Va (alexa 660); **(C).** α-HA: Antígeno HA-p12p8 (FITC); **(D).** DAPI: marcador de DNA; **(E).** Rodamina-Faloidina: marcador de citoesqueleto de actina.

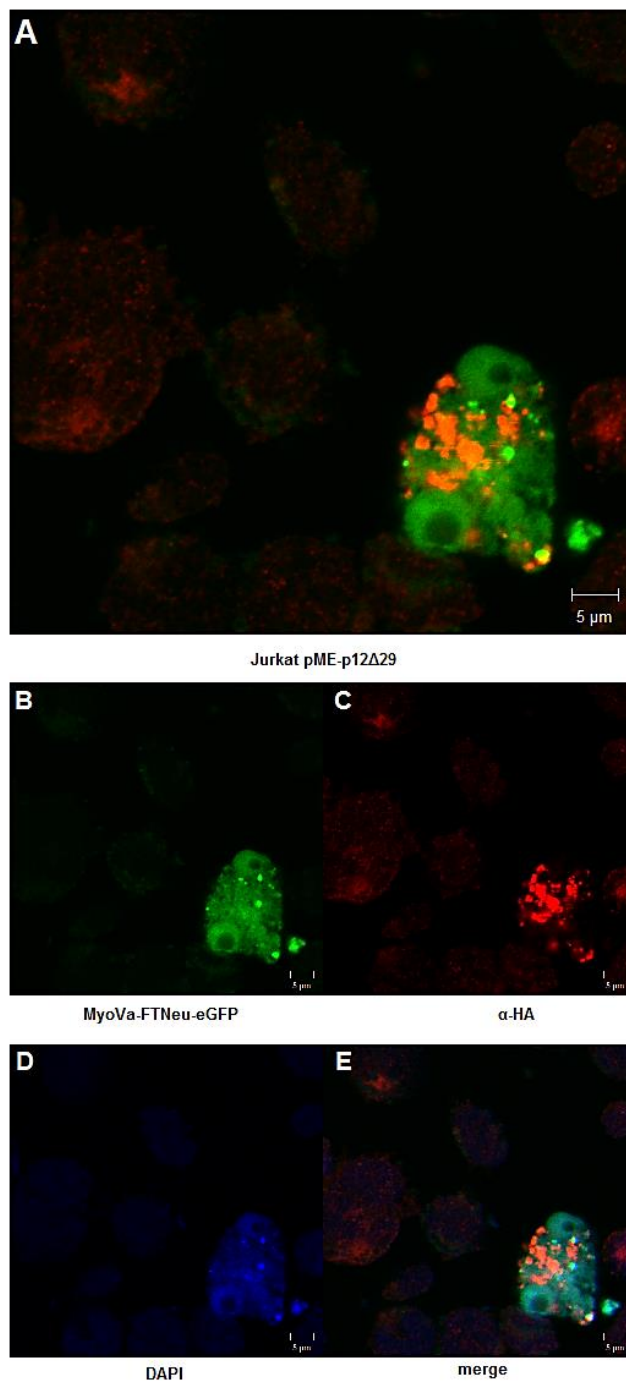
### 5.2.3 *Co-transfecção com Dominante Negativo da Miosina-Va (MyoVaFTNeu-eGFP)*

Co-localização de p12/p8 e da cauda completa da Miosina-Va forma neuronal (MyoVaFTNeu-eGFP) foi realizada em células Jurkat, por imunofluorescência, a partir das variantes que expressam p12/p8 em diferentes concentrações, co-transfectadas com o dominante negativo para Miosina-Va (MyoVaFTNeu-eGFP). Verificou-se que nas células transfectadas apenas com as variantes de p12/p8 a distribuição dessas proteínas seguiu o padrão de pontos dispersos por todo o citoplasma. Um achado interessante desse ensaio foi que apenas nas células que expressam o dominante negativo MyoVaFTNeu-eGFP houve formação de agregados citoplasmáticos de p12/p8 ao invés do padrão disperso (Figura 46). Nas células transfectadas com a variante que expressa apenas p8 (pmE-p12\_Δ29), houve formação mais intensa dos agregados proteicos em forma de grumos (Figuras 47 e 48), sugerindo que a Miosina-Va participa da dispersão celular dessas proteínas e principalmente de p8, e que a Miosina-Va pode estar envolvida no tráfego intracelular desta proteína.



**Figura 46. Formação de agregados proteicos de p12/p8 em células co-transfectadas com o dominante negativo da Miosina-Va (MyoVaFTNeu-eGFP). Microscopia confocal. Co-transfecção pME-p12WT e MyoVaFTNeu-eGFP. (A) Sobreposição. (B) Células em verde representam a expressão da cauda completa da Miosina-Va-forma neuronal conjugada com a proteína verde**

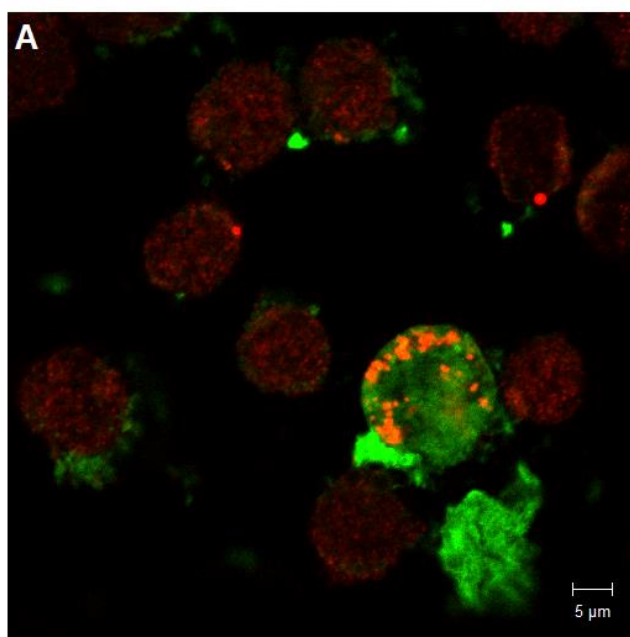
fluorescente (MyoVaFTNeu-eGFP). **(C)** Formação de agregados de p12/p8 em vermelho (antígeno HA, alexa 594) – é visualizada apenas nas células que expressam o dominante negativo MyoVaFTNeu-eGFP (setas). **(D)** DAPI: marcador de DNA; **(E)** Campo claro.



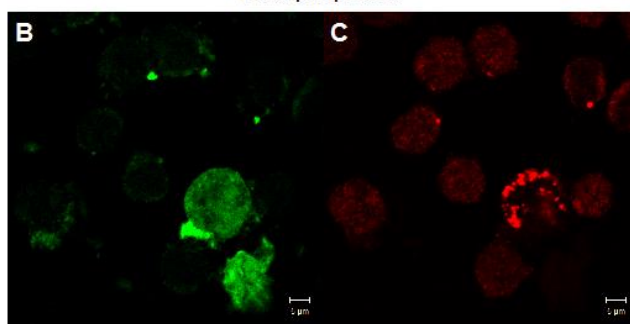
**Figura 47. Formação de agregados proteicos de p12/p8 em células co-transfectadas com o dominante negativo da Miosina-Va (MyoVaFTNeu-eGFP). Microscopia confocal. Co-transfecção**



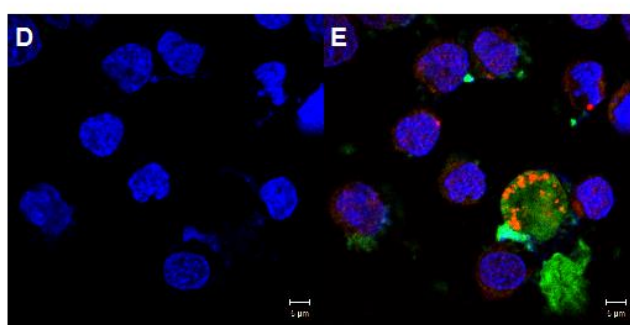
pME-p12 $\Delta$ 29 e MyoVaFTNeu-eGFP. **(A) e (E)** Sobreposição. **(B)** Células em verde representam a expressão da cauda completa da Miosina-Va-forma neuronal conjugada com a proteína verde fluorescente (MyoVaFTNeu-eGFP). **(C)** Formação de agregados de p12/p8 em vermelho (antígeno HA, alexa 594) – é visualizada apenas nas células que expressam o dominante negativo MyoVaFTNeu-eGFP (setas). **(D)** DAPI: marcador de DNA.



Jurkat pME-p12G29S



MyoVa-FTNeu-eGFP

 $\alpha$ -HA

DAPI

merge

**Figura 48. Formação de agregados proteicos de** em células co-transfectadas com o **dominante negativo da Miosina-Va (MyoVaFTNeu-eGFP)**. Microscopia confocal. Co-transfecção pME-p12G29S e MyoVaFTNeu-eGFP. **(A) e (E)** Sobreposição. **(B)** Células em verde representam a expressão da cauda completa da Miosina-Va-forma neuronal conjugada com a proteína verde fluorescente (MyoVaFTNeu-eGFP). **(C)** Formação de agregados de p12/p8 em vermelho (antígeno HA, alexa 594) – é visualizada apenas nas células que expressam o dominante negativo MyoVaFTNeu-eGFP (setas). **(D)** DAPI: marcador de DNA.

## 6 DISCUSSÃO

### *Interação entre p12/p8 e Miosina-Va*

O HTLV-1, juntamente com outros oncovírus de primatas e bovinos, codificam genes da região *pX* (DERSE et al.,1997). Embora as proteínas p12/p8, codificadas nessa região do genoma do HTLV-1, pareçam ser dispensáveis para a replicação ou imortalização de linfócitos *in vitro* (DERSE et al.,1997; FURUKAWA; SHIKU, 1991; ROBEK et al., 1998) é possível que elas tenham um papel essencial no estabelecimento de uma infecção viral persistente *in vivo* (DING et al., 2001; VAN PROOYEN et al., 2010).

Para que a transmissão do HTLV-1 através do contato célula-célula ocorra, mecanismos como a polarização de proteínas do citoesqueleto e de moléculas de adesão para o sítio de contato mostram-se importantes (IGAKURA et al., 2003). Além disso, considerando as funções de p8 na membrana celular, seu direcionamento para esta localização faz-se fundamental para o estabelecimento da infectividade deste vírus.

A capacidade de mover e posicionar organelas é essencial para a fisiologia celular eucariótica. Essa motilidade está relacionada com a ação de ATPases mecanoquímicas, dineínas e cinesinas – que estão associadas aos microtúbulos; e à ação de miosinas – que translocam filamentos de actina (ESPREAFIGO, et al. 1998).

As proteínas miosinas da classe Va localizam com marcação puntiforme na região perinuclear, em neurônios e células da glia e apresentam importante papel no transporte de pequenas vesículas e do retículo endoplasmático em células de melanoma (ESPREFICO, et al. 1998).

Neste estudo, demonstramos que a Miosina-Va apresenta interação com as proteínas acessórias virais p12/p8. Aqui, demonstramos a co-localização parcial entre as proteínas p12/p8 com a cauda medial da Miosina-Va tanto em células HeLa, quanto em células Jurkat. A demonstração dessa co-localização em células Jurkat desperta interesse, pois essas células são linfócitos T de linhagem e representam um modelo melhor para o estudo da infecção pelo HTLV-1, uma vez que este vírus tem predileção por estas células (PINON et al., 2003; MANEL et al., 2005; GHEZ et al., 2006).

A miosina-Va e as proteínas virais p12/p8 apresentam etapas em seu metabolismo, que podem ser sugeridas como processos complementares: enquanto p12 aumenta o cálcio citoplasmático por ativação das proteínas cálcio-dependente (calreticulina e calnexina), a Miosina-Va possui domínio de cadeias leves de calmodulina e atividade ATPase actina-dependente, apresentando um requerimento absoluto por cálcio (CHENEY et al., 1993; NASCIMENTO et al. 1996).

A atividade ATPase da miosina-Va é significativamente maior na presença de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), do que na ausência desse íon, o que é acompanhado também por alterações em sua conformação. Estudos demonstram, que nas etapas finais do processo de exocitose de grânulos secretórios, em altas concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$ , a

miosina apresenta sua conformação distendida, ao passo que em situações de baixas concentrações ou mesmo ausência de  $\text{Ca}^{2+}$ , a miosina Va está compactada; com os domínios cauda globular e cabeça-pescoço, interagindo entre si (EICHLER, et al. 2006).

Esse ponto comum no metabolismo das proteínas é sugestivo no processo de interação entre elas, e juntamente com os dados aqui encontrados, pode constituir uma evidência de sua associação *in vivo*, nas células infectadas pelo HTLV-1.

O domínio cauda globular da miosina-Va está relacionado com a ligação às diversas vesículas de transporte na célula (RECK-PETERSON et al., 2000). Estudos demonstraram que a miosina-Va liga-se aos melanossomos via a GTPase Rab27a e a melanofilina/Slac2-a (KURODA et al., 2003). Sabe-se que Rab27a está presente nos melanossomos independente da presença de melanofilina ou de miosina-Va, sugerindo que esta molécula constitui o elemento de reconhecimento de organelas nesse sistema (SEABRA; COUDRIER, 2004).

Nos melanócitos, a Rab27a associa-se aos melanossomos maduros e após formação do complexo Rab27a-GTP, este recruta a melanofilina, que, depois de estabilizada na superfície do melanossomo, liga-se a cauda da miosina-Va, e esta através de seu domínio motor promove a interação do complexo com os filamentos de actina e sua distribuição na extensão dos dendritos dessas células (SEABRA; COUDRIER, 2004).

Esse importante papel de miosinas não se restringe aos melanócitos, mas também está envolvido na exocitose de grânulos secretórios de insulina nas

células  $\beta$  do pâncreas; e no ouvido interno e retina, onde mutações no gene da miosina-VIIa dão origem à Síndrome de Usher tipo 1B, que inclui surdez e cegueira (EICHLER, et al. 2006; SEABRA; COUDRIER, 2004).

A co-localização entre Rab27a e as proteínas virais p12/p8 não foi demonstrada neste trabalho. No entanto, ensaios estão sendo realizados, a fim de avaliar a co-localização entre estas proteínas e também entre essas e a miosina-Va, para a proposição de um modelo de transporte de p8 até a superfície celular.

No presente estudo, demonstramos ainda, a formação de agregados proteicos, quando as células foram co-transfectadas com a construção plasmideal que expressa uma variante da miosina-Va, a qual não possui o domínio motor, mas tem sua capacidade de ligação às organelas preservada, pela presença da cauda globular (MyoVaFTNeu-eGFP), competindo com a miosina putativa pelos seus ligantes. Essa variante funciona como dominante negativo da miosina-Va.

Na presença do dominante negativo, a visualização das proteínas p12/p8 por microscopia confocal, teve seu padrão alterado, em relação a quando a forma selvagem da miosina-Va era expressa. As proteínas deixaram de apresentar o padrão puntiforme amplamente disperso no citoplasma e passaram a acumular-se em agregados proteicos, na região perinuclear. Esse dado sugere que na ausência de atividade da miosina-Va, a proteína viral p8 não é direcionada para a membrana celular, acumulando-se no citoplasma. Este achado dá indícios de que a miosina-Va desempenha um papel crítico na via pela qual p8 é dirigida até a superfície celular.

Outros estudos, utilizando o dominante negativo da miosina-Va, também já demonstraram alterações no padrão de localização e disposição de vesículas e organelas celulares. Rudolf e colaboradores (2003), por exemplo, demonstraram que a expressão do dominante negativo da miosina-Va, reduziu a motilidade e a localização cortical de grânulos secretórios em células neuroendócrinas PC12.

Em um estudo similar com células  $\beta$  pancreáticas MIN6, Varadi e colaboradores (2005), comparam o efeito de ancoragem, exocitose e agregação de grânulos secretórios de insulina, provocado pela expressão do dominante negativo, ao provocado pelo silenciamento da miosina-Va por RNA de interferência.

Pudemos observar que a alteração na localização e disposição das proteínas p12/p8, na presença do dominante negativo da miosina-Va, encontrada em nosso estudo, replica os resultados encontrados por outros pesquisadores em grupos celulares diferentes. Sugerindo mais uma vez, que a miosina-Va participa do transporte intracelular dos produtos da ORF-1 do HTLV-1.

Sabe-se que a transmissão eficiente do HTLV-1 ocorre através do contato célula-célula, o que requer a polarização do MTOC e passagem de proteínas virais diretamente para a célula alvo (BOXUS; WILLEMS, 2009; NEJMEDDINE et al., 2009; MATSUOKA; JEANG, 2007). Esse processo envolve a interação entre diversas moléculas de superfície e receptores de adesão celular, com destaque para ICAM-1 e LFA-1 (VAN PROOYEN et al., 2010 a e b ; MATSUOKA; JEANG, 2007).

Nesse contexto, já foi demonstrado que p8 aumenta a agregação de LFA-1 na membrana celular durante a sinapse virológica e amplia de maneira significativa o número de conjugados de células T, numa via dependente de citoesqueleto baseado em actina, e não em tubulina (VAN PROOYEN et al., 2010).

Corroborando com esses dados, Chevalier e colaboradores (2014) demonstraram, recentemente, que o HTLV-1 através da modulação de genes, aumenta a migração de células infectadas e a formação do contato célula-célula, através de alterações no citoesqueleto de actina e não de tubulina.

Em adição, Bizario e colaboradores (2002) já haviam demonstrado que há co-localização entre as três classes de Miosina-V e moléculas de MHC-II próximo à superfície de linfócitos T, e aumento da expressão de Miosina-V e de seu mRNA, quando essas células foram tratadas com fito-hemaglutinina, que induz a ativação de linfócitos T.

Uma vez que a Miosina-Va é um motor celular baseado em citoesqueleto de actina, e não de tubulina, e que as estruturas primárias de p12/p8 apresentam diferentes domínios, como as regiões ricas em Prolina, que podem interagir com receptores de superfície e com proteínas de sinalização celular e do citoesqueleto, os dados encontrados neste estudo sustentam a hipótese da interação entre essas proteínas não apenas no tráfego de p8 para a superfície celular, mas também na ação de p8 nas balsas lipídicas.

Diversos estudos vêm sendo realizados, a fim de melhor compreender o papel p12/p8 na infectividade e persistência viral, no entanto, até o momento, a



interação destas proteínas virais com proteínas do esqueleto celular não foi elucidada (ALBRECHT; LAIRMORE, 2002; COLLINS et al., 1998; DERSE, et al., 1997; EDWARDS et al., 2011; FUKUMOTO et al., 2009).

Baseado nos dados encontrados nesse estudo, novos ensaios com células de linhagem expressando a partícula viral completa, além de ensaios com linfócitos de indivíduos infectados devem ser realizados para confirmar os dados encontrados e contribuir para a elucidação do mecanismo de transporte de p8 para a superfície celular.

#### *Interação entre Paxilina e Tax*

Sabe-se que a infecção pelo HTLV-1 apresenta grande disseminação mundial, entretanto sua maior importância concentra-se em regiões como Caribe, África, América do Sul e Japão onde este retrovírus é endêmico (GHEZELDASHT et al., 2013). Estudo recente, realizado nessas regiões, apresentou uma estimativa de 5-10 milhões de indivíduos infectados dentre 1,5 bilhões de indivíduos avaliados (ALBRECHT; LAIRMORE, 2002; GESSAIN; CASSAR, 2012). E apesar de apenas 1% - 5% dos indivíduos HTLV-1<sup>+</sup> apresentarem a forma sintomática da infecção, suas manifestações clínicas são graves e implicam em alta morbidade (CATALAN-SOARES et al., 2001; RIBAS; MELO, 2002).

Essa morbidade relacionada às patologias neurológicas causadas pelo HTLV-1, principalmente ATLL e TSP-HAM, se devem às propriedades oncogênicas deste

retrovírus, que são atribuídas primariamente à proteína regulatória Tax, a qual induz a transformação e imortalização celular *in vitro*, assim como, a formação de tumor em camundongos transgênicos (GRASSMANN et al, 1989; POZZATTI et al., 1990; TANAKA et al., 1990; GRASSMANN et al, 1992; GROSSMAN et al., 1995).

A proteína Tax, através da interação com diversos fatores de transcrição celular, tais como CREB (proteína de ligação ao elemento responsivo a AMP cíclico), NF- $\kappa$ B e o fator soro-resposta (SRF), é responsável pela transativação da LTR do genoma viral e de diversos promotores celulares, incluindo as citocinas IL-13, IL-15, receptor de IL-2 (IL-2R $\alpha$ ) e receptores co-estimulatórios (OX40/OX40L) que em conjunto regulam positivamente a expressão proteica e ativam a cascata de sinalização celular, como a via Jak/STAT (GRASSMANN et al., 2005). Além disso, Tax promove a transativação de genes mitóticos durante a transformação celular e também inativa o gene supressor de tumor p53, contribuindo para o aumento da proliferação celular e acúmulo de mutações (ADYA; GIAM, 1995; SUZUKI, et al., 1993; TABAKIN-FIX et al., 2006).

Uma vez que Tax aumenta a expressão de diversos genes celulares e que a expressão do gene *pxn* (Paxilina) é 1,5 vezes maior em indivíduos TSP/HAM, em comparação com indivíduos não infectados, e 1,3 vezes mais expressos em indivíduos TSP/HAM em relação a indivíduos HTLV-1+ assintomáticos (PINTO et al., 2011), esperávamos encontrar, neste estudo, uma relação positiva entre a expressão de Tax e Paxilina. No entanto, observamos uma diminuição da expressão de Paxilina nas células que expressavam a proteína Tax. Estes ensaios

precisam ser repetidos em conjuntos com outras metodologias para confirmação deste achado.

Uma hipótese para explicar esse achado pode estar relacionada com a modulação de genes, via Tax, recém-descrita (CHEVALIER et al., 2014), já que esta aumenta a migração de células infectadas e a Paxilina, de modo oposto, está relacionada com adesão (TURNER, 1998; SCHALLER, 2001; DEAKING; TURNER, 2008).

Todavia, novos estudos ainda necessitam ser realizados a fim de melhor compreender a relação entre Tax e Paxilina e seu papel na infectividade pelo HTLV-1.

## **7 CONCLUSÃO**

Os resultados deste estudo evidenciam a co-localização das proteínas acessórias virais p12/p8 e miosina-Va em células de linhagem HeLa e Jurkat. Os dados mostram ainda, que na presença do dominante negativo da miosina-Va, há formação de agregados proteicos de p12/p8, além de alteração tanto na localização, quanto no padrão de disposição dessa proteína.

## 8 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos até o momento estão demonstrando que a proteína Tax reduz a expressão de Paxilina, diferentemente do que esperávamos. Acreditamos que aquisição de um anticorpo específico para detecção desta proteína permitirá a melhor análise dos dados encontrados, através da repetição dos ensaios já realizados, bem como a realização de novos ensaios.

Em relação à interação entre p12/p8 e Miosina-Va, trouxemos à discussão as funções que o citoesqueleto e seus motores celulares podem desempenhar na persistência e infectividade do HTLV-1 e acreditamos que novos ensaios, baseados nos dados encontrados nesse estudo, com células de linhagem expressando a partícula viral completa, além de ensaios com linfócitos de indivíduos infectados, podem contribuir para a elucidação do mecanismo de transporte de p8 para a superfície celular e as implicações dessa via como possível alvo terapêutico.

## REFERÊNCIAS

AKAGI, T.; SHIMOTOHNO, K. Proliferative response of Tax1-transduced primary human T cells to anti-CD3 antibody stimulation by an interleukin-2-independent pathway. **J. Virol.**, v. 67, p. 1211-1217, 1993.

ALBRECHT, B.; LAIRMORE, M. D. Critical role of human Tlymphotropic virus type 1 accessory proteins in viral replication and pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, p. 396–406, 2002.

BANGHAM, C. R. The Immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. **J. Gen. Virol.**, v. 84, p. 3177-3189, 2003.

BASTIAN, I.; et al. Isolation of a human T-lymphotropic virus type I strain from Australian aboriginals. **J. Virol.**, v. 67, p. 843-851, 1993.

BERG, J. S.; POWELL, B. C.; CHENEY, R. E. A millennial myosin census. **Mol. Biol. Cell.**, v. 12, n. 4, p. 780-794, 2001.

BIASIOTTO, R. et al. The p13 protein of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) modulates mitochondrial membrane potential and calcium uptake. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1797, n. 6-7, p. 945-951, 2010.

BIZÁRIO, J. C. S. et al. Myosin-V colocalizes with MHC class II in blood mononuclear cells and is up-regulated by T-lymphocyte activation. **Journal of Leukocyte Biology** v. 71, p. 195-204, 2002.

BOND, L. M. et al. Myosin motor proteins are involved in the final stages of the secretory pathways. **Biochem Soc Trans**, v. 39, n. 5, p. 1115-1119, 2011.

BORGES, A. C. Expressão de um fragmento da Miosina Va inibe o crescimento de tumores de melanoma induzidos em modelo animal. 100 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2012.

BRADY, J. et al. Identification of p40x-Responsive Regulatory sequences within the Human T-Cell Leukemia Virus Type I Long Terminal Repeat. **J. Virol.**, v. 61, n. 7, p. 2175-2181, 1987.

CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, v. 2, p. 30, 2005.

CANN, A. J.; CHEN, I. S. Y. Human T-cell leukemia virus types I and II. *In*: FIELDS, B. N. et al. (Ed.). **Fields Virology**. 3. rd ed. Philadelphia: Raven Publishers, 1996. v 2, p. 1849-1879.

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.C. 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. Saúde Pública**, v. 21, n.3, p. 926-931, 2005.

CATALAN-SOARES, B.; PROIETTI, F. A.; CARNEIRO PROIETTI, A. B. F. Os vírus linfotrópicos de células T humanas (HTLV) na última década (1990-2000). Aspectos epidemiológicos. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 4, p. 81-95, 2001.

CHEN, I. S.; QUAN, S. G.; GOLDE, D. W. HTLV-I transforms normal human lymphocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v 80, p. 7006-7009, 1983.

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

CHENEY, R. E. et al. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. **Cell**, v. 75, p. 13–23, 1993.

CHEVALIER, S. A. et al. Gem-induced cytoskeleton remodeling increases cellular migration of HTLV-1-infected cells, formation of infected-to-target T-cell conjugates and viral transmission. **PLoS Pathog**. v. 10, n. 2, p. 1-19, 2014.

CHOCIAY, M. F. Mapeamento dos subdomínios estruturais da cauda da miosina Va requeridos na função de transporte dos melanossomos. 2003. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2003.

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, set, 1996.

CIMINALE, V. et al. Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type I. **J. Virol**, v. 66, p. 1737-1745, 1992.

COLLINS N.D. et al. Selective ablation of human T-cell lymphotropic virus type 1 p12I reduces viral infectivity in vivo. **Blood**, v. 9, n. 12, p. 4701- 4707, 1998.

CORTES, E. et al. HIV-1, HIV-2 and HTLV-I in high-risk groups in Brazil. **N. Engl. J. Med.**, v. 320, n. 15, p. 953-8, 1989.

DE THÉ, G.; BOMFORD, R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? **AIDS Res. Hum. Retroviruses.**, v.9, n. 5, p. 381-386, 1993.

DEAKIN, N. O; TURNER, C. E. Paxillin comes of age. **J. Cell Sci.**, v. 121, p. 2435-2444, 2008.

DEKABAN, G. A. et al. The HTLV-I ORF-I protein is recognized by serum antibodies from naturally infected humans and experimentally infected rabbits. **Virology**, v. 274, n 1, p. 86-93, 2000.

DERSE, D.; MIKOVITS, J.; RUSCETTI, F. X-I and X-II open reading frames of HTLV-I are not required for virus replication or for immortalization of primary T-cells in vitro. **Virology**, v. 237, n. 1, p. 123-128, 1997.

DING, W. et al. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 p12I Expression Increases Cytoplasmic Calcium to Enhance the Activation of Nuclear Factor of Activated T Cells. **J, Virol.**, v. 76, n. 20, p. 10374-10382, 2002.

DING, W. et al. Endoplasmic reticulum and cis-Golgi localization of human T-lymphotropic virus type 1 p12<sup>I</sup>: association with calreticulin and calnexin. **J. Virol.**, v. 75, p. 7672–7682, 2001.

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, p. 527-31, 2003.

DUMAS, M. et al. Seroepidemiology of HTLV-I/II in Benin, West Africa. **AIDS Res Hum. Retroviruses**, v. 7, p. 447-451, 1991.

EDLICH, R. F.; ARNETTE, J. A.; WILLIAMS, F. M. Global epidemic of human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I): an update. **J. Long. Term .Eff. Med. Implants.**, v. 13, p. 127-140, 2003.

EDWARDS, D. et al. HTLV-1 Orf-I and Orf-II-Encoded Proteins in Viral Infection and Persistence. **Viruses**, v. 3, n. 6, p. 861-885, 2011.



EICHLER, T. W. et al. The role of myosin Va in secretory granule trafficking and exocytosis. **Biochem Soc Trans**, v. 34, n. 5, p. 671-674, 2006.

ESPREADICO, M. E. et al. Localization of myosin-V in the centrosome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 8636–8641, 1998.

FENIZIA, C. et al. Human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 p30, but not p12/p8, counteracts toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 signaling in human monocytes and dendritic cells. **J. Virol.**, v. 88, n. 1, p. 393-402, 2014.

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

FINBOW, M. E. et al. The E5 oncoprotein target: A 16 kDa channel-forming protein with diverse functions. **Mol. Carcinog.**, v. 4, n. 6, p. 441-444, 1991.

FRANCHINI, G.; STREICHER, H. Human T-cell leukemia virus. **Baillière's Clin. Haematol.**, v. 8, p. 131-148, 1995.

FRANCHINI, G. Review: molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. **Blood**, v. 86, p. 3619-3639, 1995.

FRANCHINI, G. et al. The human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I p12I protein cooperates with the E5 oncoprotein of bovine papillomavirus in cell transformation and binds the 16-kilodalton subunit of the vacuolar H ATPase. **J. Virol.**, v. 67, p. 7701–7704, 1993.

FUKUMOTO, R. et al. Inhibition of T-cell receptor signal transduction and viral expression by the linker for activation of T cells-interacting p12(I) protein of human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1. **J. Virol.**, v. 81, p. 9088-9099, 2007.

FUKUMOTO, R. et al. In vivo genetic mutations define predominant functions of the human T-cell leukemia/lymphoma virus p12I protein. **Blood**, v. 113, n. 16, p. 3726-3234, 2009.

FURUKAWA, K.; FURUKAWA, K.; SHIKU, H. Alternatively spliced mRNA of the pX region of human T lymphotropic virus type I proviral genome. **FEBS Lett**, v. 295, p. 141–145, 1991.

FURUKAWA, K. et al. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) p12I is dispensable for HTLV-I transmission and maintenance of infection in vivo. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 20, n. 10, p. 1092-1099, 2004.

GALLO, R. C. et al. Origin of human T-cell leukemia-lymphoma virus. **Lancet**, v. 2, n. 8356, p. 962-3, 1983.

GALVÃO-CASTRO, B. et al. Epidemiologia e origem do HTLV-I em Salvador estado da Bahia: a cidade com a mais elevada prevalência desta infecção no Brasil. **Gaz. Med. Bahia**, v. 79, n. 1, p. 3-10, 2009.

GALVÃO-CASTRO, B. et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type-I among blood donors: a Nationwide Brazilian study. **Transfusion**, v. 37, n. 2, p. 242-3, 1997.

GASMI, M. et al. Long terminal repeat sequence analysis of HTLV type I molecular variants identified in four north African patients. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v.10, p. 1313-1315, 1994.

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. **J. Virol.**, v. 76, p. 12813-12822, 2002

GELMANN, E.P. et al. Molecular cloning of a unique T-cell leukemia virus (HTLV-II Mo) **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.81, p. 993- 997, 1984.

GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v.2, p. 407-409, 1985

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 Infection. **Front Microbiol.**, v. 15, n. 3, p. 388, 2012.

GESSAIN, 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.**, v. 88, p. 7694-7698, 1991

GESSAIN, A. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, v. 2, p. 30, 2005.

GESSAIN, A. et al. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. **J. Virol.**, v. 66, n. 4, p. 2288-95, 1992.

GHEZ, D. et al. Neuropilin-1 is involved in Human T-cell Lymphotropic virus type 1 entry. **J. Virol.**, v. 80, p. 6844-6854, 2006.

GHEZELDASHT A. S. et al. Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Oncogenesis: Molecular Aspects of Virus and Host Interactions in Pathogenesis of Adult T cell Leukemia/Lymphoma (ATL). **Iran. J. Med. Sci.**, v. 16, n.3, p. 179, 2013.

GOFF, S. P. The Retroviruses and Their Replication In: **Fields Virology**. editors-in-chief, David M. Knipe, Peter M. Howley ; associate editors, Diane E. Griffin Fourth Edition Lippincott Williams & Wilkins, cap. 57, EUA, 2001.

GOLDSTEIN, D. J. et al. The bovine papillomavirus E5 oncoprotein binds to the 16 kilodalton component of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases. **Nature**, v. 352, p. 347, 1991.

GRASSMANN, R. et al. Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. **J. Virol.**, v. 66, p. 4570-4575, 1992.

GRASSMANN, R. et al. Transformation to continuous growth of primary human T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type I X-region genes transduced by a Herpesvirus saimiri vector. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 3351-3355, 1989.

GREEN, P. L.; CHEN, I. S. Y. **Fields Virology** (4th edn. Knipe D, Howley P, Griffin D, Lamb R, Martin M and Straus S (eds).) Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia p. 1941–1969, 2001.

GROSSMAN, W. J. et al. Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.92, p. 1057-1061, 1995.

HAHN, B.H. et al. Molecular cloning and analysis of a new variant of human T-cell leukemia virus (HTLV-1b) from an African patient with adult T-cell Leukemia-lymphoma. **Int. J. Cancer**, v.34, p. 613-618, 1984.

HALL, W. W. et al. HTLV-II: emergence of an important newly recognized pathogen. **Seminars. Virology.**, v. 5, p. 165-178, 1994.

HANCHARD, B. et al. Human Retrovirology: HTLV. Blattner, W. A. (ed.). **Raven Press**: New York, p. 173-183, 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.

IGAKURA, T. et al. Spread of HTLV-1 between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. **Science**, v. 299, p.1713, 2003.

JOHNSON, J. M. et al. Free major histocompatibility complex class I heavy chain is preferentially targeted for degradation by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12(I) protein. **J. Virol.**, v. 75, n. 13, p. 6086-6094, 2001.

KALYANARAMAN, V. S. et al. A new subtype of HTLV-II associated with a Tcell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, p. 571-573, 1982.

KNIGHT, S. C. et al. Dendritic cells in HIV-1 and HTLV-1 infection. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 329, p. 545-549, 1993.

KORALNIK, I. J. et al. In vitro infection of human macrophages by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 8, p. 1845-1849, 1992.

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.

KURODA, T. S.; ARIGA, H.; FUKUDA, M. The Actin-Binding Domain of Slac2-a/Melanophilin Is Required for Melanosome Distribution in Melanocytes **Mol. Cell. Biol**, v. 23, n. 15, p. 5245–5255, 2003.

LA GRENADE, L. HTLV-1 associated infective dermatitis: past, present and future. **J Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, v. 13, sup. 1, p. 46-49, 1996.

LAIRMORE, M. D. et al. Absence of human T-cell lymphotropic virus type I co-infection in human immunodeficiency virus-infected hemophilic men. **Blood**, v. 74, n. 7, p. 2596-2599, 1989.

MAEDA, Y. et al. Prevalence of possible adult T-cell leukemia virus-carriers among volunteer blood donors in Japan: a nation-wide study. **Int. J. Cancer**, v. 33, n. 6, p. 717-720, 1984.

MAHIEUX, R. et al. Molecular epidemiology of 58 new African Human T-cell Leukemia Virus Type I (HTLV-I) strains: identification of a new and distinct HTLVI molecular subtype in Central Africa in Pygmies. **J. Virol.**, v. 71, p. 1317-1333, 1997.

MAHIEUX, R. et al. Simian T-cell lymphotropic virus type I from *Mandrillus sphinx* as a simian counterpart of human T-cell lymphotropic virus type I subtype D. **J. Virol.**, v.72, p. 10316-10322, 1998.

MALBEC, M. A New Role for the HTLV-1 p8 Protein- Increasing Intercellular Conduits and Viral Cell-to-Cell Transmission. **Viruses**, v.3, n. 3, p. 254-259, 2011.

MANEL, N. et al. HTLV-1 tropism and envelope receptor. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6016-6025, 2005.

MANNS, A.; HISADA, M.; LA GRENADE, L. Human T-Lymphotropic Virus Type I Infection. **The Lancet**, v. 353, p. 1951-1956, 1999.

MATSUOKA, M.; JEANG, K. T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature**, v. 7, n. 4, 270-280, 2007.

MERLE, H. et al. Ocular Manifestations in patients with HTLV-I associated infection – a clinical study of 93 cases. **Jpn. J. Ophthalmol.**, v.40, p. 260-270, 1996.

MIURA, T.; FUKUNAGA, I.; IGARASHI, T. 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, p. 1124-1127, 1994.

MOCHIZUKI, M. et al. HTLV-I Uveitis. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrov.**, 1996; v. 13, p S50-S56.

MORGAN O. S. et al. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. **Lancet**, v. 2, p. 1184-1187, 1989.

MUELLER, N. The epidemiology of HTLV-I infection. **Cancer Causes & Control**, v. 2, p. 37-52, 1991.

MULLOY, J. C. et al. The human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12I protein binds the interleukin-2 receptor beta and gamma(c) chains and affects their expression on the cell surface. **J. Virol.**, v. 70, p. 3599–3605, 1996.

MURPHY, E. L. et al. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I). Seroprevalence in Jamaica. **Am. J. Epidemiol.**, v. 133, p.1114-1124, 1991.

MURPHY, E. L. et al. Increased incidence of infectious diseases during prospective follow-up of HTLV-I and II- infected blood donors. **Arch. Intern. Med.**, v. 159, p. 1485-1491, 1999.

NASCIMENTO, A. A. C. et al. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. **J. Biol. Chem**, v. 271, p. 17561–17569, 1996.

NEJMEDDINE, M.; BANGHAM, C. R. M. The HTLV-1 Virological Synapse. **Viruses**, v. 2, p. 1427-1447, 2010.

NELSON, N. Structure, molecular genetics, and evolution of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPases. **J. Bioenerg. Biomembranes**, v. 21, p. 553, 1989.

NICOT, C. et al. HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. **Nat. Med.**, v. 10, p. 197-201, 2004.

NISHIOKA, K.; SUMIDA, T.; HASUNUMA, T. Human T lymphotropic virus type I in arthropathy and autoimmune disorders. **Arthritis Rheum.** v. 39, p. 1410-1418, 1996.

OSAME, M. et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**, v. 1, p. 1031-1032, 1986.

PAIS-CORREIA, A. M. et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. **Nat. Med.**, v. 16, n. 1, p. 83-90, 2010.

PESSÔA, R. et al. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 1 full and partial genomes by illumina massively parallel sequencing technology. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. 1-9, 2014

PINON, J. D. et al. Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. **J. Virol.**, v. 77, p. 9922-9930, 2003.

PINTO, M. Perfil de expressão gênica de linfócitos T CD4<sup>+</sup> na infecção pelo HTLV-1. 2011. 124 fl. **Dissertação** – *Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, 2011.*

PIQUE, C.; JONES, K. S. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. **Front Microbiol.**, v. 3, p. 378, 2012.

POIESZ, B. et al. Detection and isolation of type C retroviruses from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 77, p. 7415-7419, 1980.

POPOVIC, M. et al. The virus of Japanese adult T-cell leukaemia is a member of the human T-cell leukaemia virus group. **Nature**, v.300, n. 5887, p. 63-66, 1982.

POZZATTI, R.; VOGEL, J.; JAY, G. The human T-lymphotropic virus type I tax gene can cooperate with the ras oncogene to induce neoplastic transformation of cells. **Mol. Cell Biol.**, v. 10, p. 413-417, 1990.

RECK-PETERSON, S. L. et al. Class V myosins. **Bochim. Biophys. Acta**, v. 1496, n. 1, p. 36-51, 2000.

ROBEK, M. D.; WONG, F. H.; RATNER, L. Human T-cell leukemia virus type 1 pX-I and pX-II open reading frames are dispensable for the immortalization of primary lymphocytes. **J. Virol.**, v. 72, p. 4458±4462, 1998.

RODGERS-JOHNSON, P. et al. HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 2, p. 1247-1248, 1985.

ROMÁN, G. S.; OSAME, M. Identity of HTLV-I associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I associated myelopathy. **Lancet**, v. 1, n. 8586, p. 651, 1988.

RUDOLF, R. et al. Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells. **J Cell Sci**, v. 116, n. 7, p. 1339-1348, 2003.

SAKSENA, N. K. et al. LTR sequence and phylogenetic analyses of a newly discovered variant of HTLV-I isolated from the Hagahai of Papua New Guinea. **Virology**, v. 189, n. 1, p. 1-9, 1992.

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

SCHALLER, M. D. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. **Oncogene**, v. 20, p. 6459-6472, 2001.

SEABRA, M. C.; COUDRIER, E. Rab GTPases and Myosin Motors in Organelle Motility. **Traffic**, v. 5, p. 393–399, 2004.

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.

SHIMOTOHNO, K. et al. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 82, p. 3101-3105, 1985.

Silic-Benussi M1, Biasiotto R, Andresen V, Franchini G, D'Agostino DM, Ciminale V. HTLV-1 p13, a small protein with a busy agenda. **Mol. Aspects. Med.**, v. 31, p.350-8, 2010.

SONG, K. et al. Sequence and phylogenetic analyses of human T cell lymphotropic virus type I from a Brazilian woman with adult T cell leukemia: comparison with virus strains from South America and the Caribbean basin. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 52, n. 1, p. 101-8, 1995.

TANAKA, A. et al. Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, p. 1071-1075, 1990.

TANGY, F. The epidemiology of HTLV-I. In: *HTLV, truths and questions*. Zaninovic, V. (eds). Colombia, Cali, Feriva Editores, p. 1-13, 1996.

TITUS, M. A. Motor proteins: myosin V--the multi-purpose transport motor. **Curr Biol**, v. 7, n. 5; p. R301-304, 1997.

TROVATO, R. et al. A lysine-to-arginine change found in natural alleles of the HTLV-I p12I protein greatly influences its stability. **J. Virol.**, v. 73, p. 6460±6467, 1999.

TURNER, C. E. Molecules in focus Paxillin. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 30, p. 955-959, 1998.

UCHIYAMA, T. et al. Adult T-cell leukemia: clinical and hematological features of 16 cases. **Blood**, v. 50, p. 481-92, 1977.

VALERI, V. W. et al. Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3809-3817, 2010.

VAN DOOREN, S. et al. Evidence for a post-Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus in Latin America. **J. Gen. Virol.**, v. 79, p. 2695-708, 1998.

VAN GELE, M.; DYNODT, P.; LAMBERT, J. Griscelli syndrome: a model system to study vesicular trafficking. **Pigment. Cell & Melanoma Res.**, v. 22, n. 3, p. 268-282, 2009.

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, p. 20738–20743, 2010.

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, p. 4327-40, 1998.



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, p. 212-223, 1994.

VARADI, A.; TSUBOI, T.; RUTTER, G. A. Myosin Va transports dense core secretory vesicles in pancreatic MIN6 beta-cells. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 6, p. 2670-2680, 2005.

VERDONK, K. et al. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **Lancet Infect. Dis.**, v. 7, p. 266–81, 2007.

VERGER, P. Flux et reflux de la traite des nègres entre le Golfe de Benin et Bahia de Todos os Santos. **Mouton and Company**, 1968.

VERGER, P. Mouvement des navires. In Verger, P. Trade relations between the Bight of Benin and Bahia, 17th to 19th century, trans. Evelyn Crawford, Ibadan, **Ibadan University Press**. p. 24-26, 1976.

VIANA-FILHO, L. O negro na Bahia. 3a edição. Rio de Janeiro: **Nova Fronteira**, p. 31-224, 1988.

VICENTE-MANZANARES, M.; SÁNCHEZ-MADRID, F. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 110-122, 2004.

VIDAL, A.U. et al. Phylogenetic classification of human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. **J. Gen. Virol.**, v. 75, p. 3655-66, 1994.

VOYLES, B.A **Biology of Viruses**. St Louis, Missouri, Mosby, p.386. 1993

WATANABE, T. HTLV-1-associated diseases. **Int J Hematol**, v. 66, n. 3, p. 257-278, 1997.

WATTEL, E. et al. Clonal expansion of infected cells: a way of life for HTLV-I. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovir.**, v. 13, sup. 1, p. S92-99, 1996.

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. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 102, p. 7994-9, 2005.

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

YAMAMOTO, N. et al. Transformation of human leukocytes by cocultivation with an adult T cell leukemia virus producer cell line. **Science**, v. 217, n. 4561, p. 737-739, 1982.

YANAGIHARA, R. et al. Serological discrimination of HTLV I and II infection in Melanesia (letter). **Lancet**, v. 337, p. 617-618, 1991.

**ANEXO A****Manuscrito em preparação****ROLE OF MYOSIN-VA ON HTLV-1 p8<sup>I</sup> PROTEIN TRAFFIC TO CELL SURFACE**

---

Jaqueline Goes de Jesus<sup>1</sup>; Rui Milton Patrício da Silva Júnior<sup>2</sup>; Simone Kashima Haddad<sup>3,4</sup>; Maria Enilza Espreáfico<sup>2</sup>; Luiz Carlos Júnior Alcântara

1 Hematology, Genetic and Computational Biology Laboratory / Gonçalo Moniz Research Center - Oswaldo Cruz Foundation, (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil.

2 Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, São Paulo University, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

3 Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

4 Blood Center of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil.

**Corresponding author:**

Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara,

LHGB/CPqGM/FIOCRUZ

Rua Waldemar Falcão, nº 121, Candeal, Salvador, Bahia, CEP 40296-710, Brazil.

Phone: 55 71 3176 2255

Email: lalcan@bahia.fiocruz.br

**Abstract**

HTLV-1 ORF-I encodes the 99 amino acid p12 protein which can be proteolytically cleaved at the amino terminus to generate the p8 protein. The first proteolytic cleavage removes the ER retention/retrieval signal at the amino terminus of p12, while the second cleavage generates the p8 protein. The p12 protein localizes to cellular endomembranes, within the ER and Golgi apparatus, while p8 traffics to lipid rafts at the cell surface and is recruited to the immunological synapse upon T-cell receptor (TCR) ligation. In secretory vesicle transport, vesicles produced as post-Golgi are moved along the cytoskeleton by motor proteins. The unconventional myosin motor, myosin V, moves several cargoes including secretory vesicles, synaptic vesicles, and the endoplasmic reticulum. To understand if p8 traffics from Golgi apparatus to cell surface on a myosin Va dependent manner, Jurkat T cells were transfected with pMEp12 plasmids which express variants (p12WT, p12 $\Delta$ 29 and p12G29S) of the fusion protein of HTLV-1 p12<sup>I</sup> tagged with the influenza hemagglutinin (HA1) tag and with the Myo Va full-tail neuronal-eGFP conjugated (MyoVa FTNeu-eGFP) plasmid which expresses a negative dominant of myosin Va and competes for intracellular ligands with cellular putative myosin. Both p12/p8 and myosin Va proteins intracellular localization were analyzed by indirect immunofluorescence assay using antibodies against the HA-tag and the Myo Va protein. Confocal microscopy and image collection was performed by using a p12<sup>I</sup>/p8<sup>I</sup> proteins Zeiss LSM 780 microscope (Carl Zeiss Optical, Chester, Va.) with Adobe Photoshop CC software. It was reported p12<sup>I</sup> expression in Jurkat T as previous described was shown in perinuclear region which might be RE and Golgi apparatus and that p12<sup>I</sup>/p8<sup>I</sup> and MyoVa proteins colocalizes, however only when MyoVa FTNeu-eGFP was simultaneously

expressed with pMEp12 plasmids, p12<sup>I</sup>/p8<sup>I</sup> localization showed to be altered from dots dispersed all over cytoplasm and cell surface to form cytoplasmic aggregates independently on variant of p12<sup>I</sup> expressed, suggesting that myosin Va plays an important role on traffics of p8<sup>I</sup> from Golgi to cell surface.

**Keywords:** HTLV-1; Accessory proteins; ORF-I; p12/p8; Myosin Va.

## Introduction

Human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) was the first human retrovirus described being associated with adult T-cell leukemia/lymphoma, (ATLL) in Japan (1, 2). Subsequently, the virus was associated with tropical spastic paraparesis (TSP) (3,4) and HTLV-associated myelopathy (HAM) (5), which it is the same pathology and is currently known for TSP/HAM (6). HTLV is able to establish a persistent infection in humans and is the only retroviruses to present oncogenic properties in this specie (2). Besides ATLL and HAM/TSP, HTLV-1 is etiologically associated with several inflammatory manifestations that include arthropathy, polymyositis, uveitis, infectious dermatitis, keratoconjunctivitis sicca, Sjögren's syndrome, etc. (7-12).

The genome of HTLV-1 shows the basic structure of retroviruses, consisting of four structural genes (gag, pro, pol, and env), flanked by two LTR sequences essential for integration of proviral DNA into the host genome and its transcriptional regulation (13,14). In addition, HTLV-1 contains a unique sequence between env and 3' LTR, called pX region where four open reading frames (ORFs) are transcribed yielding regulatory tax and rex proteins, and accessory proteins (p12, p13, p30 and HBZ) that together play an important role in infectivity and viral persistence (15-17).

The only processed mRNA (single spliced) from the ORF-I encoding the p12 protein that contains 99 amino acids and is characterized by its high hydrophobicity (18, 19). Studies have demonstrated that p12 is located in endomembranes compartment residing in the endoplasmic reticulum (ER), Golgi complex and lipid rafts (20-22).

In the environment of ER, p12 is physically associated, to the cytoplasmic portion of the  $\beta$  chain and the transmembrane portion of the  $\gamma$  chain of the interleukin 2 receptor (IL2-R), holding them and increasing the phosphorylation of transduction signaling and activator of transcription 5 (STAT5), which decreases T cell activation threshold, thus increasing their responsiveness to interleukin 2 (IL-2) (17, 23-26). Also, the binding of p12 to the newly synthesized heavy chains of the Major Histocompatibility Complex class I (MHC-I), prevents the association of this with the  $\beta$ 2-microglobulin, directing that to degradation by the proteasome, thus reducing its expression on the cell surface and reducing the production of immunogenic peptides resulting in a form of escape from host immune response. p12 also acts on the nuclear factor of activated T cells (NFAT), through increased cytoplasmic calcium via activation of calcium-dependent proteins residing in RE, calreticulin and calnexin (27).

In contrast to p12 functions, p8 binds to TCR and negatively regulate its proximal signaling in a LAT-dependent event (17); p8 also increases the aggregation of antigen lymphocyte function-associated 1 (LFA-1) and together, these events result in low viral production, evasion of the immune system for recognition by natural killer cells (NK) and cytotoxic lymphocytes (CD8 +), and the recruitment of non-infected cells (28).

Recently, Van Prooyen and coworkers (15) demonstrated that p8 induces increase of the number and length of cytoplasmic extensions, called cellular conduits, which promote communication between different cell types. Through such conduits, viral particles and p8 protein itself are quickly transferred from one infected cell to another not infected cell. In the new infected cell, p8 also induces the formation of cellular conduits, increasing cell

contact and promotes cell anergy contributing to evasion of the host immune system (18, 28).

Although the proteins p12 / p8 appear to be dispensable for replication or immortalization of lymphocytes in vitro (29-31) it is possible that they have an essential role in the establishment of a persistent viral infection in vivo (15, 28, 32).

Recent studies have demonstrated that analysis of the products of ORF-I patients infected with HTLV-1 had severe substitutions of amino acids that affect the pattern of cleavage of these proteins, suggesting that p12 functions related to the ER and to membrane can contribute to the survival and proliferation of the host cells infected (17).

It is known that after proteolytic cleavage of the precursor p12, the cleaved product p8, is directed to the cell membrane, being located in lipid rafts. The mechanisms by which travels p8 the Golgi complex to the membrane and organelles that are responsible for this function have not yet been described.

Considering the need of the formation of virological synapse, biofilms and/or conduits for transmitting the virus through cell-cell contact, mechanisms such as the polarization of cytoskeletal proteins and adhesion molecules to the contact site, are shown important in the transmission of HTLV-1. The polarizing membrane events involve the performance of a series of proteins that promote the reorientation of the microtubule organizing center (MTOC) (IGAKURA et al., 2003). A protein that is believed to be related to this process is the Myosin Va, a motor protein that performs various functions in cell migration, phagocytosis, cytokinesis, organelle transport, cell polarization and membrane traffic (34-36).



Myosin Va is contained within a superfamily of cell motors protein that generate motion along actin filaments in ATP-dependent manner (34). This protein has been closely associated with the final stages of the process and exocytosis and is known to promote the capture of pigment granules in melanocytes actin filaments (37). Mutations in the Myosin Va gene cause Grisceli Syndrome, a rare autosomal recessive disease characterized by thinning of skin pigments and hair, due to the accumulation of melanosomes in the perinuclear region of melanocytes and consequent deficiency in their traffic to keratinocytes (38, 39). To understand whether p8 traffic from the Golgi apparatus to the cell surface occurs on a myosin Va-dependent manner, confocal microscopy and co-localization analysis assays were performed.

## **Material and Methods**

### *Plasmid construction*

The plasmid construction used to express the p12 and p8 proteins were provided by the research group coordinated by Dr. Genoveffa Franchini (Center for Cancer Research, National Cancer Institute, National Institutes of Health - USA). Variants of p12/p8 used here correspond to mutations found in individuals infected with HTLV-1, which show different patterns of cleaved and uncleaved forms of this protein by Western blot (Table 1). These mutations were then introduced, by site directed mutation in vector pME18SDSL HAtag-expression; except  $\Delta 29$  variant, which do not correspond to any mutation found in patients and was established in order to predict completely cleaved form, p8 (17, 22).

### *Cell culture*

HeLa and Jurkat cells were used for the tests. Cells were cultured, respectively, in the middle Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and RPMI supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and penicillin-streptomycin 1mM. The cells were grown in culture plates of 100 (60mm) or T75 flasks under controlled temperature (37°C), concentration of CO<sub>2</sub> (5%) and humidity (80%). The culture medium was changed every two days, or as needed prior to this period. The protocol for exchange medium consisted of removing the medium, washed twice with 1X PBS and cells re-add appropriate volume of medium. For removal of adherent cells, when the exchange of the culture vessel was necessary, continued with the initial stages of the exchange medium and after two washes with PBS 1X was added 1X trypsin-EDTA and the plate incubated or T75 flask at 37 ° C for 4 minutes, followed by inactivation of trypsin by addition of at least twice its volume of supplemented culture medium; after trypsin treatment, the entire volume was centrifuged at 1000rpm for 4 minutes, the supernatant was then discarded and the pellet containing cells was resuspended in DMEM supplemented and transferred to new culture vessel.

### *DNA transfection*

DNA transfection assays were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) as supplied by the manufacturer. For immunocytochemistry assays, cells were distributed on Ø13mm coverslips in 24-well plates at a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/well and plates were incubated for 24h at 37, 5% CO<sub>2</sub> and 80% humidity. After the incubation period, 2µg plasmid DNA of each variant were transfected per well, and the cells were incubated

again for 48 hours, at which time immunocytochemistry was performed, followed by analysis by confocal microscopy.

### *Immunohistochemistry*

Immunohistochemistry assays were performed for intracellular labeling of HA-tag antigen and Myosin Va expressed by the constructs. The protocol consisted of the following steps: cells were fixed at 37°C with 4% paraformaldehyde solution (pH7.4) for 15 minutes, then washed twice with 1x PBS (5 minutes each), permeabilized with Triton-X100 0,3% and again washed once with 1x PBS (5 minutes). Thereafter, free aldehydes were blocked with 100mM glycine, and the cells were washed three times with 1x PBS (5 minutes each). The nonspecific sites were blocked with 2% BSA solution for 2 hours, followed by incubation with primary antibody ( $\alpha$ -HA – Roche or  $\alpha$ -CM – in house) diluted in 2% BSA solution for 1 hour. Cells were washed three times with 1x PBS (5 minutes each) and incubated with secondary antibody (Alexa conjugated – Life Technologies) and rhodamine-phalloidin diluted in 2% BSA solution for 30 minutes. Then the cells were washed five times with 1xPBS (5 minutes each) and slides were mounted using mounting medium containing DAPI Fluormount 6 $\mu$ L (for nuclear staining).

### *Confocal microscope*

The slides were scanned in Confocal Microscope Zeiss LSM 780 (multiphotons) from the Department of Cellular and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto

Medical School (FMRP / USP). Images were acquired using the same parameters configured from non-transfected cells (negative control) also stained with primary and secondary antibodies for immunocytochemistry, to reduce the background fluorescence

## Results

The cellular localization of p12/p8 in HeLa cells, expressing the variant forms of this protein in different concentrations, corroborate with data previously described in the literature (17). The pME plasmideal construction does not contain the coding sequence for ORF-1 and HA-antigen was not detected by immunofluorescence assay.

Co-localization of p12/p8 and Myosin Va medial-tail (Myo5CM) was performed in HeLa and Jurkat cells, by immunofluorescence, from variants that express p12/p8 in different concentrations. In HeLa cells transfected with empty vector pME, HA-antigen was not detected, as expected (Figure 1) and Myo5CM was found in the perinuclear region probably Golgi and centrosomes as previously described in the literature.

It was observed that in HeLa cells, p12/p8 and Myo5CM did not co-localize in the perinuclear region, where p12 fraction is predominant, resident of reticulum and Golgi complex (pME-p12WT and pME-p12\_P34L variants) (Figures 2 and 3). In cells transfected with variants that express only (pME-p12\_Δ29) or predominantly p8 (SME-p12\_D26N), it was found punctual co-localization of this protein with Myo5CM in cytoplasmic aggregates viewed as thick spots.

In Jurkat cells, there was co-localization of p12/p8 and Myo5CM on membrane of transfected cell with the wild variant pME-p12WT, which expresses the p12 isoform in higher concentrations (Figure 4).

Also in transfected cells expressing only p8 variants (pME-p12\_Δ29) we showed co-localization of these proteins aggregate in thick perimembranes (Figure 44 - arrow). On the other hand, in cells where the p12 isoform (pME-p12\_G29S) was expressed more co-localization of this protein with Myo5CM could be observed in addition to the cell membrane, as dots scattered in the cytoplasm.

*Co-transfection with Dominant Negative Myosin-Va (MyoVaFTNeu-eGFP)*

Co-localization of p12/p8 and the Myosin Va full-tail neuronal eGFP-conjugated (MyoVaFTNeu-EGFP) was performed in Jurkat cells by immunofluorescence from variants that express p12/ p8 in different concentrations.

It was found that in cells transfected only the with p12/p8 variants, proteins distribution followed the pattern of spots scattered throughout the cytoplasm. An interesting finding of this test was that only in cells expressing the dominant negative MyoVaFTNeu-eGFP there was cytoplasmic clusters formation of p12/p8 instead of stray pattern (Figure 5). In cells transfected with the variant that expresses only p8 (pME-p12\_Δ29), this clusters of protein was more intense, suggesting that Myosin Va plays a role on cellular localization and transport of this protein.

## Discussion

HTLV-1 along with other primates and bovine oncoviruses genes encoding the pX region (29). While p12/p8 proteins encoded in this region of the HTLV-1 genome, appear to be dispensable for replication or immortalization of lymphocytes in vitro (29-31) it is possible that they have a key role in the establishment of a persistent viral infection in vivo (15, 26).

For the transmission of HTLV-1 by cell-to-cell contact occurs, mechanisms such as polarization of cytoskeletal proteins and adhesion molecules to the contact site prove to be important (33). Moreover, considering the functions of p8 in the cell membrane, its direction for this location is of fundamental importance to establish the infectivity of the virus.

The ability to move and position organelles are essential for eukaryotic cell physiology. This motility is related to the role of ATPases, dineínas kinesins and - that are associated with microtubules; and the action of myosins - that translocate actin filaments (40).

The myosin Va protein class with punctiform staining locates in the perinuclear region in neurons and glial cells and plays an important role in the transport of small vesicles in the endoplasmic reticulum and melanoma cells (40).

In this study, we demonstrated that myosin-Va features interaction with the viral accessory proteins p12/p8. Here, we demonstrate the partial co-localization between p12/p8 protein with medial tail Myosin-Va both in HeLa cells, as in Jurkat cells. The demonstration of this co-localization arouses interest in Jurkat cells because these cells are T lymphocyte lineage and represent a better model for the study of HTLV-1, since this virus is prevalent in these cells (41-43).

Myosin Va and p12 p8 viral proteins have steps in their metabolism, that can be suggested as complementary processes: whereas p12 increases cytoplasmic calcium by the activation of calcium-dependent proteins (calreticulina and calnexin), the Myosin Va has calmodulin light chain and actin -dependent ATPase activity, with an absolute requirement for calcium (44, 45).

The ATPase activity of myosin-Va is significantly higher in the presence of calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), than in the absence of this ion, which is also accompanied by changes in its conformation. Studies have shown that in the final stages of the process of exocytosis of secretory granules at high concentrations of  $\text{Ca}^{2+}$ , myosin presents its stretched conformation, whereas in situations of low concentration or absence of  $\text{Ca}^{2+}$ , myosin Va is compressed; with globular tail and head-neck domains, interacting with each other (46).

This common point in protein metabolism is suggestive in the process of interaction between them, and together with the data found here may constitute evidence of their association *in vivo*, in cells infected with HTLV-1.

The globular tail domain of myosin-Va is related to the binding to various transport vesicles in the cell (35). Studies demonstrated that myosin Va, binds to melanosomes the via GTPase Rab27a and melanofilina / Slac2 to (47). It is known that Rab27a is present in melanosomes independent of the presence of or myosin Va or melanofilina, suggesting that this molecule is the organelle recognition element in this system (48).

In melanocytes, the Rab27a joins the mature melanosomes and after formation of Rab27a-GTP complex, recruits this melanofilina, which then stabilized at the surface of melanosomes binds myosin Va tail, and this through his motor domain promotes

interaction of the complex with actin filaments and their distribution in the length of dendrites of these cells (48).

This important role of myosin is not restricted to melanocytes, but is also involved in exocytosis of secretory granules of insulin in pancreas  $\beta$  cells; and the inner ear and retina where mutations in myosin VIIa gene give rise Usher Syndrome type 1B, including blindness and deafness (46,48).

The co-location between Rab27a and viral proteins p12/p8 has not been demonstrated in this work. However, studies are being conducted in order to assess the co-location of these proteins and also between these and the myosin-Va, to propose a p8 transport model to the cell surface.

The present study also demonstrated the formation of protein aggregates when the cells were co-transfected with a plasmid construct expressing a variant of the myosin Va, which lacks the motor domain but has a capacity to bind to organelles by the presence of globular tail (MyoVaFTNeu-eGFP). This variant competes with the putative myosin by its ligands, acting as myosin-Va dominant negative.

In the presence of dominant negative, visualization of p12/p8 protein by confocal microscopy, had its pattern altered, compared to when wild-type myosin Va was expressed. Proteins failed to present the standard pitting widely dispersed in the cytoplasm and began to build up protein aggregates, in the perinuclear region. This suggests that in the absence of myosin-Va activity, viral protein p8 is not directed to the cell membrane and accumulates in the cytoplasm. This finding provides evidence that myosin-Va plays a critical role in the way in which p8 is directed to the cell surface.



Other studies using the dominant negative myosin-Va, also have shown alterations in the location and transport of vesicles and organelles. Rudolf and coworkers (49), for example, have shown that expression of the dominant negative-myosin Va, reduced motility and cortical location of neuroendocrine secretory granules in PC12 cells.

In a similar study with  $\beta$  pancreatic cells MIN6, Varadi and coworkers (50) compared the effect of docking, exocytosis and aggregation of secretory granules of insulin, caused by expression of dominant negative as caused by silencing of myosin-Va by interference RNA.

We observed that changes in location and staining of the p12/p8 protein in the presence of dominant negative myosin-Va, found in our study, replicate the results found by other researchers in different cell groups. Suggesting, once again that the myosin Va plays a role in intracellular transport of ORF-1 of HTLV-1 products.

It is known that the efficient transmission of HTLV-1 occurs via cell-cell contact, which requires the polarization of the MTOC and towards the. This process involves the interaction between different surface molecules and cell adhesion receptors, especially ICAM-1 and LFA-1 (15, 51-52).

In this context, it has been shown that p8 aggregation increases LFA-1 on the cell membrane during the virological synapse and significantly expands the number of T cell conjugated in the actin-based cytoskeleton dependent pathway and not tubulin (15).

Corroborating these data, Chevalier et al (53) demonstrated recently that HTLV-1 through modulation of genes, enhances the migration of infected cells and the formation of cell-cell contact, through changes in the actin cytoskeleton and not tubulin.

In addition, Bizario et al (54) had shown the co-localization of the three classes of myosin-V and MHC-II molecules near the surface of T lymphocytes, and increase of Myosin-V expression and its mRNA when these cells were treated with phytohemagglutinin, which induces activation of T lymphocytes.

Once the Myosin Va is a cellular motor actin cytoskeleton based, and not tubulin, and that the primary structure of p12/p8 have different domains, such as proline-rich regions, which can interact with surface receptors, cell signaling protein and cytoskeleton, the data obtained in this study support the hypothesis that the interaction between these proteins not only in the p8 traffic to the cell surface, but also the action of p8 in lipid rafts.

Several studies have been conducted in order to better understand the p12/p8 role in infectivity and viral persistence, however, yet, the interaction of these viral proteins with cellular skeleton proteins was not elucidated (16-17, 29, 55-57).

Based on the data found in this study, new tests with cell line expressing the complete viral particle, and trials with individuals infected lymphocytes should be performed to confirm the data found and contribute to the elucidation of the p8 transport mechanism to the cell surface.

## References

1. UCHIYAMA, T. et al. Adult T-cell leukemia: clinical and hematological features of 16 cases. **Blood**, v. 50, p. 481-92, 1977.
2. POIESZ, B. et al. Detection and isolation of type C retroviruses from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 77, p. 7415-7419, 1980.
3. GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v.2, p. 407-409, 1985
4. RODGERS-JOHNSON, P. et al. HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 2, p. 1247-1248, 1985.
5. OSAME, M. et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**, v. 1, p. 1031-1032, 1986
6. ROMÁN, G. S.; OSAME, M. Identity of HTLV-I associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I associated myelopathy. **Lancet**, v. 1, n. 8586, p. 651, 1988.
7. MORGAN O. S. et al. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. **Lancet**, v. 2, p. 1184. – 1187, 1989.
8. LA GRENADÉ, L. HTLV-1 associated infective dermatitis: past, present and future. **J Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, v. 13, sup. 1, p. 46-49, 1996.
9. MERLE, H. et al. Ocular Manifestations in patients with HTLV-I associated infection – a clinical study of 93 cases. **Jpn. J. Ophthalmol.**, v.40, p. 260-270, 1996.
10. MOCHIZUKI, M. et al. HTLV-I Uveitis. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrov.**, 1996; v. 13, p S50-S56.
11. NISHIOKA, K.; SUMIDA, T.; HASUNUMA, T. Human T lymphotropic virus type I in arthropathy and autoimmune disorders. **Arthritis Rheum.** v. 39, p. 1410-1418, 1996.
12. WATANABE, T. HTLV-1-associated diseases. **Int J Hematol**, v. 66, n. 3, p. 257-278, 1997.

13. GREEN, P. L.; CHEN, I. S. Y. **Fields Virology** (4th edn. Knipe D, Howley P, Griffin D, Lamb R, Martin M and Straus S (eds).) Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia p. 1941–1969, 2001.
14. PESSÔA, R. et al. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 1 full and partial genomes by illumina massively parallel sequencing technology. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. 1-9, 2014
15. 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, p. 20738–20743, 2010.
16. EDWARDS, D. et al. HTLV-1 Orf-I and Orf-II-Encoded Proteins in Viral Infection and Persistence. **Viruses**, v. 3, n. 6, p. 861-885, 2011.
17. FUKUMOTO, R. et al. In vivo genetic mutations define predominant functions of the human T-cell leukemia/lymphoma virus p12I protein. **Blood**, v. 113, n. 16, p. 3726-3234, 2009.
18. FRANCHINI, G.; STREICHER, H. Human T-cell leukemia virus. **Baillière's Clin. Haematol.**, v. 8, p. 131-148, 1995.
19. KORALNIK, I. J. et al. In vitro infection of human macrophages by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 8, p. 1845-1849, 1992.
20. JOHNSON, J. M. et al. Free major histocompatibility complex class I heavy chain is preferentially targeted for degradation by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12(I) protein. **J. Virol.**, v. 75, n. 13, p. 6086-6094, 2001.
21. DING, W. et al. Endoplasmic reticulum and cis-Golgi localization of human T-lymphotropic virus type 1 p12I: association with calreticulin and calnexin. **J. Virol.**, v. 75, p. 7672–7682, 2001.
22. FUKUMOTO, R. et al. Inhibition of T-cell receptor signal transduction and viral expression by the linker for activation of T cells-interacting p12(I) protein of human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1. **J. Virol.**, v. 81, p. 9088-9099, 2007.
23. MULLOY, J. C. et al. The human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12I protein binds the interleukin-2 receptor beta and gamma(c) chains and affects their expression on the cell surface. **J. Virol.**, v. 70, p. 3599–3605, 1996.

24. NICOT, C. et al. HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. **Nat. Med.**, v. 10, p. 197-201, 2004.
25. DEKABAN, G. A. et al. The HTLV-I ORF-I protein is recognized by serum antibodies from naturally infected humans and experimentally infected rabbits. **Virology**, v. 274, n 1, p. 86-93, 2000.
26. DING, W. et al. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 p12I Expression Increases Cytoplasmic Calcium to Enhance the Activation of Nuclear Factor of Activated T Cells. **J. Virol.**, v. 76, n. 20, p. 10374-10382, 2002.
27. DING, W. et al. Endoplasmic reticulum and cis-Golgi localization of human T-lymphotropic virus type 1 p12I: association with calreticulin and calnexin. **J. Virol.**, v. 75, p. 7672–7682, 2001.
28. MALBEC, M. A New Role for the HTLV-1 p8 Protein- Increasing Intercellular Conduits and Viral Cell-to-Cell Transmission. **Viruses**, v.3, n. 3, p. 254-259, 2011.
29. DERSE, D.; MIKOVITS, J.; RUSCETTI, F. X-I and X-II open reading frames of HTLV-I are not required for virus replication or for immortalization of primary T-cells in vitro. *Virology*, v. 237, n. 1, p. 123-128, 1997.
30. ROBEK, M. D.; WONG, F. H.; RATNER, L. Human T-cell leukemia virus type 1 pX-I and pX-II open reading frames are dispensable for the immortalization of primary lymphocytes. *J. Virol.*, v. 72, p. 4458±4462, 1998.
31. FURUKAWA, K. et al. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) p12<sup>I</sup> is dispensable for HTLV-I transmission and maintenance of infection in vivo. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 20, n. 10, p. 1092-1099, 2004.
32. VALERI, V. W. et al. Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3809-3817, 2010.
33. IGAKURA, T. et al. Spread of HTLV-1 between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. **Science**, v. 299, p.1713, 2003.
34. TITUS, M. A. Motor proteins: myosin V--the multi-purpose transport motor. **Curr Biol**, v. 7, n. 5; p. R301-304, 1997.

35. RECK-PETERSON, S. L. et al. Class V myosins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1496, n. 1, p. 36-51, 2000
36. BERG, J. S.; POWELL, B. C.; CHENEY, R. E. A millennial myosin census. **Mol. Biol. Cell.**, v. 12, n. 4, p. 780-794, 2001.
37. BOND, L. M. et al. Myosin motor proteins are involved in the final stages of the secretory pathways. **Biochem Soc Trans**, v. 39, n. 5, p. 1115-1119, 2011.
38. CHOCIAY, M. F. Mapeamento dos subdomínios estruturais da cauda da miosina Va requeridos na função de transporte dos melanossomos. 2003. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, 2003.
39. VAN GELE, M.; DYNOODT, P.; LAMBERT, J. Griscelli syndrome: a model system to study vesicular trafficking. **Pigment. Cell & Melanoma Res.**, v. 22, n. 3, p. 268-282, 2009.
40. ESPREAFICO, M. E. et al. Localization of myosin-V in the centrosome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 8636-8641, 1998.
41. PINON, J. D. et al. Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. **J. Virol.**, v. 77, p. 9922-9930, 2003.
42. MANEL, N. et al. HTLV-1 tropism and envelope receptor. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6016-6025, 2005.
43. GHEZ, D. et al. Neuropilin-1 is involved in Human T-cell Lymphotropic virus type 1 entry. **J. Virol.**, v. 80, p. 6844-6854, 2006.
44. NASCIMENTO, A. A. C. et al. Enzymatic characterization and functional domain mapping of brain myosin-V. **J. Biol. Chem**, v. 271, p. 17561-17569, 1996.
45. CHENEY, R. E. et al. Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. **Cell**, v. 75, p. 13-23, 1993.
46. EICHLER, T. W. et al. The role of myosin Va in secretory granule trafficking and exocytosis. **Biochem Soc Trans**, v. 34, n. 5, p. 671-674, 2006.

47. KURODA, T. S.; ARIGA, H.; FUKUDA, M. The Actin-Binding Domain of Slac2-a/Melanophilin Is Required for Melanosome Distribution in Melanocytes **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, n. 15, p. 5245–5255, 2003.
48. SEABRA, M. C.; COUDRIER, E. Rab GTPases and Myosin Motors in Organelle Motility. **Traffic**, v. 5, p. 393–399, 2004.
49. RUDOLF, R. et al. Myosin Va facilitates the distribution of secretory granules in the F-actin rich cortex of PC12 cells. **J Cell Sci**, v. 116, n. 7, p. 1339-1348, 2003.
50. VARADI, A.; TSUBOI, T.; RUTTER, G. A. Myosin Va transports dense core secretory vesicles in pancreatic MIN6 beta-cells. **Mol Biol Cell**, v. 16, n. 6, p. 2670-2680, 2005.
51. NEJMEDDINE, M.; BANGHAM, C. R. M. The HTLV-1 Virological Synapse. **Viruses**, v. 2, p. 1427-1447, 2010.
52. MATSUOKA, M.; JEANG, K. T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature*, v. 7, n. 4, 270-280, 2007.
53. CHEVALIER, S. A. et al. Gem-induced cytoskeleton remodeling increases cellular migration of HTLV-1-infected cells, formation of infected-to-target T-cell conjugates and viral transmission. *PLoS Pathog.* v. 10, n. 2, p. 1-19, 2014.
54. BIZARIO, et al
55. ALBRECHT. B.; LAIRMORE, M. D. Critical role of human Tlymphotropic virus type 1 accessory proteins in viral replication and pathogenesis. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, p. 396–406, 2002.
56. LAIRMORE, M. D. et al. Absence of human T-cell lymphotropic virus type I co-infection in human immunodeficiency virus-infected hemophilic men. **Blood**, v. 74, n. 7, p. 2596-2599, 1989.
57. COLLINS N.D. et al. Selective ablation of human T-cell lymphotropic virus type 1 p12I reduces viral infectivity in vivo. **Blood**, v. 9, n. 12, p. 4701- 4707, 1998.

**Table 1.**

<b>Plasmid constructions to express p12/p8<sup>1</sup></b>	<b>Features</b>
pME	Do not express neither p12 nor p8
pME-p12WT-HA	Expresses p12 and p8 proteins in approximately equal concentrations
pME-p12-P34L-HA	Expresses p12 and p8 proteins in roughly equal concentrations, but higher than the concentrations vector PME-HA-p12WT
pME-p12- $\Delta$ 5-L6M/G29S/P34L/F61L-HA	Contains deletion of the first five amino acids in addition to changing the amino acid at positions 6, 29 and 61, expressing almost entirely the p12 protein
pME-p12-D26N-HA	Expresses p8 protein at levels greater than the p12 protein
pME- $\Delta$ 29-HA	Contains deletion of the 29 first amino acids, expressing only p8 protein
pME-p12-G29S-HA	Presents amino acid change at position 29, expressing almost entirely the p12 protein



Figure 1

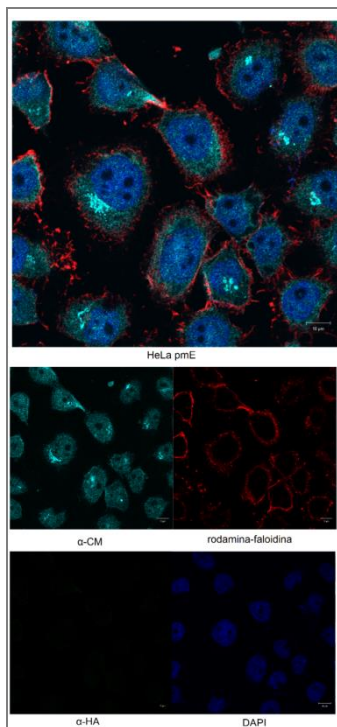


Figure 2

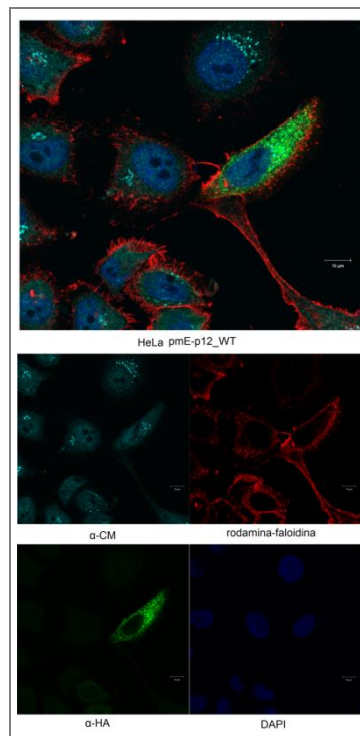


Figure 3

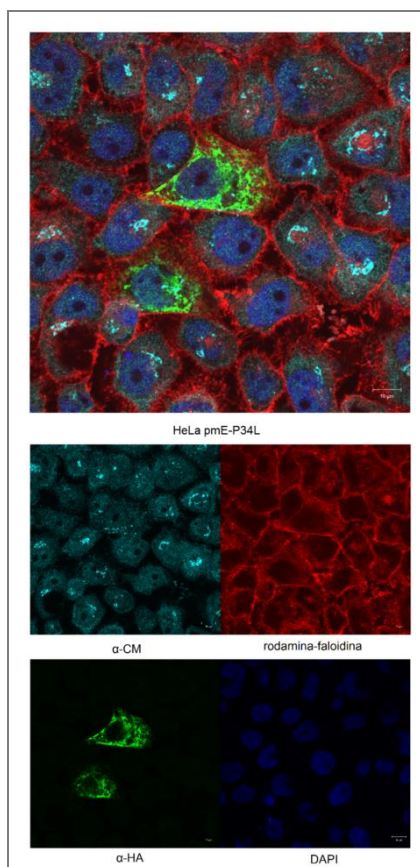


Figure 5

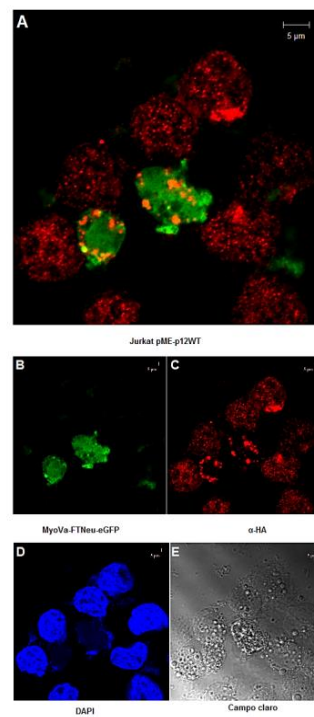
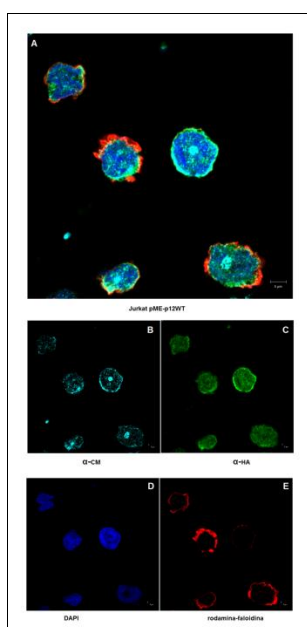


Figure 4



## Legends

**Figure 1. Cellular localization of the medial tail Myosin-Va.** HeLa cells transfected with the construct PME, which contains the coding sequence for ORF-1. Negative control for expression of p12p8.

**Figure 2. Expression of p12p8 and medial tail Myosin-Va.** HeLa cells transfected with the SME-p12\_WT construction (wild sequence p12p8).

**Figure 3. Immunofluorescence p12p8 and medial tail Myosin-Va.** HeLa cells transfected with the pME-p12\_P34L construction (predominantly expressed p12).

**Figure 4. Antigen HA and  $\alpha$ -CM MyoVa co-located in the membrane of T-lymphocytes (Jurkat).** (A). Overlap (B).  $\alpha$ -CM: medial Tail Myosin-Va (Alexa 660); (C)  $\alpha$ -HA: HA antigen-p12p8 (FITC); (D). DAPI: DNA marker; (E). Rhodamine phalloidin: actin cytoskeleton marker.

**Figure 5. Formation of protein aggregates p12 / p8 cells co-transfected with the dominant negative-myosin Va (MyoVaFTNeu-eGFP).** Confocal microscopy. Co-transfection pME-p12WT and MyoVaFTNeu-eGFP. (A) Overlay. (B) represents green cells expressing the complete tail-Myosin Va-shaped neuronal conjugated to green fluorescent protein (eGFP-MyoVaFTNeu). (C) Aggregate Formation p12 / p8 red (HA antigen, alexa 594) - is seen only in cells that express the dominant negative MyoVaFTNeu-eGFP (arrows). (D) DAPI: DNA marker; (E) Light field.