

Mariane Dahmer

**AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DE GRP78/BiP EM
CÉLULAS DE INDIVÍDUOS HIV POSITIVOS SOB
DIFERENTES ESQUEMAS TERAPÊUTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina como requisito
obrigatório para a obtenção do Grau de
Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo
Roberto Pinto

Coorientador: Dr. Jair Alexander
Téllez Meneses

Florianópolis
2014

Mariane Dahmer

**AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DE GRP78/BiP EM
CÉLULAS DE INDIVÍDUOS HIV POSITIVOS SOB
DIFERENTES ESQUEMAS TERAPÊUTICOS**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para
obtenção do Grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Florianópolis, 21 de novembro de 2014

BANCA EXAMINADORA:


Presidente:	AGUINALDO ROBERTO PINTO	Nota:	10,0
Membro Titular:	PATRÍCIA HERMES STOCO	Nota:	10,0
Membro Titular:	RICARDO CASTILHO GARCEZ	Nota:	10,0
Membro Suplente:	IZABELLA THAÍS DA SILVA	Nota:	10,0

MÉDIA FINAL: 10 (DC2)

Florianópolis, 21 de Novembro de 2014.



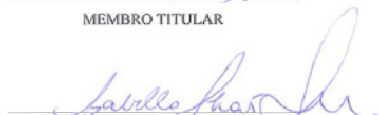
PRESIDENTE DA BANCA



MEMBRO TITULAR



MEMBRO TITULAR



MEMBRO SUPLENTE

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a confecção deste trabalho:

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto e concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Ao meu orientador Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto pelos ensinamentos, pela confiança, pelo apoio e dedicação. Obrigada por me orientar mesmo que à distância, possibilitando que eu aproveitasse as oportunidades que surgiram ao longo do caminho. Eu te admiro muito!

Ao meu coorientador Dr. Jair A. T. Meneses pela ajuda, pela paciência, pelo incentivo e pelo conhecimento transferido.

À Prof. Dr. Célia R. M. Barardi pelo empréstimo de equipamentos e por ser sempre tão atenciosa.

À Mariana Borsa e ao Yuri Tonello pela preparação das amostras utilizadas neste trabalho e pela amizade.

Ao Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina, Hospital Regional Dr. Homero de Miranda Gomes e Centro de Testagem e Aconselhamento de São José-SC pelo recrutamento dos indivíduos, bem como coleta das amostras utilizadas no presente estudo.

Às integrantes do Laboratório de Imunologia Aplicada Vânia A. Mareze e Íris M. Santos pelo companheirismo, pela amizade, pelas discussões científicas e principalmente por fazerem com que os meus dias no laboratório fossem muito mais agradáveis.

Às minhas antigas companheiras de apartamento Aline Viancelli e Juliana Tessari pela agradável companhia. Foi muito bom compartilhar grande parte da minha graduação com vocês!

Aos meus atuais companheiros de apartamento Erika N. Saito, Larissa Z. da Silva e Moacyr B. Filho. Sem vocês, escrever o TCC não teria a menor graça. Obrigada pela ajuda, pelos conselhos e pelo incentivo durante esta etapa. Vocês se tornaram muito especiais pra mim!

Às minhas amigas Priscila B. Delben, Sheila S. Kerber, Gislaiane L. Rowedder, Verônica R. C. de Souza, Mariana C. Zucchi e Carla S. Rosa, as quais eu considero a minha segunda família. Obrigada pelo carinho, amizade e companheirismo durante a graduação. Vocês foram essenciais para a minha formação.

Aos alunos da turma de Ciências Biológicas 2009.2. Certamente há um pouco de cada um de vocês na minha formação pessoal e profissional.

Às minhas amigas do outro lado do mundo Anna Morper, Charu Agarwal, Hanna Ciesielski, Friederike Hoffmann, Aušra Girdžiušaitė e Nadine Albrecht. A dedicação, o foco e o interesse de vocês por tudo o que fazem são características que eu levarei para sempre comigo. Ter conhecido vocês certamente me tornou muito mais preparada para escrever este trabalho. *Ich vermisse euch.*

À minha amiga Morgana Glombowsky pelos 20 anos de amizade e companheirismo.

À minha amiga-irmã Jéssica M. Furtado pela presença constante mesmo que distante. É muito bom saber que eu sempre poderei contar contigo!

Ao Fernando S. dos Santos pelo amor, incentivo, compreensão e paciência. Saber que eu tenho você me torna uma pessoa muito mais forte. Certamente grande parte do que eu sou hoje, devo a você. *Ich liebe dich!*

Aos meus pais Luzia R. Dahmer e Almiro Dahmer por todo o amor e carinho e por estarem sempre presentes. Obrigada pelo apoio, pelo incentivo, pelo suporte e por sempre fazerem de tudo pela minha felicidade. Eu amo muito vocês!

À minha irmã Renata R. Dahmer pela amizade e pelo exemplo. Eu te amo muito.

RESUMO

O retículo endoplasmático é responsável pela síntese, dobramento e algumas modificações de proteínas que serão secretadas ou proteínas de membrana. Situações de hipoglicemia, hipóxia, distúrbios na regulação de cálcio intracelular, infecções virais e administração de fármacos antirretrovirais podem comprometer o correto funcionamento desta organela, resultando em acúmulo de proteínas mal dobradas e consequente ativação da via UPR (*unfolded protein response*). Esta via busca restabelecer a homeostasia celular através de controles transcricionais e traducionais, incluindo o aumento transcricional da chaperona GRP78/BiP sendo, portanto, considerado um indicador de estresse no retículo endoplasmático e consequente ativação da via UPR. Diversos estudos demonstram que os vírus modulam a ativação desta via a fim de evitar que ela impeça a replicação viral. São escassos, porém, os estudos relacionando a infecção pelo HIV e a administração de fármacos antirretrovirais na ativação da via UPR. O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da infecção pelo HIV e do tratamento antirretroviral na transcrição de GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺ e monócitos provenientes de indivíduos HIV positivos sob diferentes esquemas terapêuticos. Para tanto, os níveis de RNAm codificantes para GRP78/BiP foram quantificados em relação aos níveis de RNAm codificantes para os genes de referência β 2M e GAPDH através da metodologia de RT-qPCR. Foi observado um aumento significativo da transcrição de GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺ provenientes de indivíduos HIV positivos em comparação aos indivíduos HIV negativos, sugerindo que a via UPR estava ativa. Este aumento, porém, não foi relacionado ao esquema terapêutico utilizado. Adicionalmente, demonstrou-se que o aumento transcricional de GRP78/BiP estava correlacionado a um aumento traducional. O aumento da produção de GRP78/BiP é vantajoso para a replicação do HIV, uma vez que esta chaperona é essencial para o dobramento e consequentemente para a funcionalidade das proteínas virais. Adicionalmente, GRP78/BiP atua detectando proteínas mal dobradas, evitando que sejam formadas partículas virais contendo proteínas não funcionais, além de prevenir a morte da célula hospedeira. Dessa forma, GRP78/BiP pode ser considerada um importante alvo terapêutico no combate à infecção pelo HIV.

Palavras-chave: Aids. HIV. *Unfolded protein response*. GRP78/BiP

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via UPR (<i>unfolded protein response</i>).....	20
Figura 2 – Curvas de dissociação dos iniciadores GRP78/BiP, β 2M e GAPDH.....	41
Figura 3 – Curva padrão para avaliação da eficiência de amplificação dos iniciadores GRP78/BiP, GAPDH e β 2M.....	42
Figura 4 – Comparação das eficiências de amplificação dos iniciadores GRP78/BiP, GAPDH e β 2M.....	43
Figura 5 – Níveis de RNAm de GRP78/BiP em relação aos níveis de RNAm dos genes de referência GAPDH e β 2M em linfócitos T CD4 ⁺ e em monócitos	45
Figura 6 – Correlação entre os níveis de RNAm de GRP78/BiP e proteína GRP78/BiP em linfócitos T CD4 ⁺ e monócitos.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos iniciadores utilizados nas reações em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).....	35
Tabela 2 – Variação das concentrações de RNA total extraído de linfócitos T CD4 ⁺ e monócitos.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

Aids: síndrome da imunodeficiência adquirida
ATF4: *activating transcription factor 4*
ATF6: *activating transcription factor 6*
BCL-2: *B-cell CLL/lymphoma 2*
BiP: *binding protein*
BIK: *BCL-2-interacting killer*
BLAST: *basic local alignment search tool*
 β 2M: *beta-2-microglobulin*
C: grupo controle (voluntários HIV negativos)
cDNA: DNA complementar
CHOP: *C/EBP homologous protein*
CMV: citomegalovírus
Cq: ciclo quantitativo
CTA: Centro de Testagem e Aconselhamento
DENV: vírus da dengue
EDEM: *ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein*
eIF2: *eukaryotic initiation factor 2*
ERAD: *ER-associated degradation*
GADD34: *growth arrest and DNA damage-inducible 34*
GAPDH: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
GDP: guanosina difosfato
GRP78: *glucose-regulated protein 78kDa*
GRP94: *glucose-regulated protein 94kDa*
GTP: guanosina trifosfato
HBV: vírus da hepatite B
HCV: vírus da hepatite C
HEMOSC: Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina
HIV: vírus da imunodeficiência humana
HSP70: *heat shock protein 70kDa*
HSV-1: vírus herpes simplex do tipo 1
IP/r: inibidor da protease reforçado com ritonavir
IRE1: *inositol-requiring enzyme 1*
ITRN/ITRNt: inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e nucleotídeos
ITRNN: inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo
LTR: *long terminal repeat*
PERK: *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*
PKR: *RNA-dependent protein kinase*
qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

RE: retículo endoplasmático

RT: transcrição reversa

RT-qPCR: transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

SFB: soro fetal bovino

ST: grupo sem tratamento (voluntários HIV positivos)

TCI: grupo sob tratamento antirretroviral com inibidor da protease (voluntários HIV positivos)

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

TSI: grupo sob tratamento antirretroviral sem inibidor da protease (voluntários HIV positivos)

UPR: *unfolded protein response*

UTR: *untranslated region*

XBP-1: *X-box binding protein 1*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. IDENTIFICAÇÃO E ATIVAÇÃO DOS COMPONENTES DA VIA UPR	19
1.2. GRP78/BiP	21
1.3. VIA UPR E INFECÇÕES VIRAIS	23
1.4. VIA UPR E HIV	24
2. OBJETIVOS	29
2.1. OBJETIVO GERAL	29
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. METODOLOGIA	31
3.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO	31
3.2. SEPARAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES CELULARES	31
3.3. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL	32
3.4. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE RNA COM DNASE	33
3.5. TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)	33
3.6. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)	34
4. RESULTADOS	39
5. DISCUSSÃO	47
6. SUMÁRIO DE RESULTADOS	57
7. PERSPECTIVAS	59
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	73
ANEXO 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	73

1. INTRODUÇÃO

As proteínas são sintetizadas na forma de cadeias lineares de aminoácidos. Esta estrutura, porém, não as confere funcionalidade. Para se tornarem biologicamente ativas, as proteínas devem adotar uma estrutura tridimensional precisa (STIRLING; LUNDIN; LEROUX, 2003). Embora esta estrutura seja determinada pela sequência de aminoácidos (DOBSON; SALI; KARPLUS, 1998), muitas proteínas requerem o auxílio de chaperonas moleculares para que o dobramento seja preciso e para que ocorra em uma escala de tempo biologicamente relevante (HARTL, 1996). Proteínas parcialmente dobradas ou mal dobradas tendem a formar agregados, devido a forças hidrofóbicas, além de não serem funcionais (HARTL; BRACHER; HAYER-HARTL, 2011). Dada a sua importância, os compartimentos celulares responsáveis pelo dobramento proteico apresentam mecanismos capazes de detectar e corrigir erros durante este processo (MORI, 2009).

O retículo endoplasmático (RE) é a organela responsável pela síntese e dobramento de proteínas que serão secretadas ou proteínas de membrana (RUTKOWSKI; KAUFMAN, 2004), as quais compreendem um terço das proteínas celulares (LEE, 2007). No RE também ocorrem modificações pós-traducionais essenciais para o correto dobramento das proteínas. Essas modificações incluem a clivagem do peptídeo sinal, glicosilação N-terminal, adição de glicofosfatidilinositol e a formação de pontes dissulfeto entre resíduos de cisteína (ELLGAARD; HELENIUS, 2003). Para desempenhar corretamente as suas funções, o lúmen do RE apresenta algumas particularidades, sendo considerado um ambiente celular único. Ele contém a maior concentração intracelular de cálcio e é um ambiente oxidativo, essencial para a formação de pontes dissulfeto e para o correto dobramento de proteínas. Além disso, o lúmen do RE é rico em chaperonas moleculares cuja ação é dependente de cálcio, tais como GRP78/BiP (*glucose-regulated protein 78kDa/binding protein*) e calreticulina, as quais estabilizam a estrutura das proteínas e auxiliam o seu correto dobramento (ORRENIUS; ZHIVOTOVSKY; NICOTERA, 2003; MA; HENDERSHOT, 2004; SCHRÖDER; KAUFMAN, 2005).

Situações de hipoglicemia, distúrbios na regulação de cálcio, infecções virais e hipóxia (KAUFMAN *et al.*, 2002; RON, 2002) podem impedir o correto funcionamento do RE, resultando em um acúmulo de proteínas não dobradas ou mal dobradas no seu interior (RUTKOWSKI; KAUFMAN, 2004). A hipoglicemia afeta o processo de glicosilação N-terminal. Essa modificação pós-traducional é reconhecida pelas

chaperonas calnexina e/ou calreticulina, as quais auxiliam o correto dobramento de proteínas ao impedir a formação de agregados e a exportação prematura dessas proteínas do RE (RUTKEVICH; WILLIAMS, 2010). A remoção do resíduo de glicose desta modificação desfaz a interação entre as proteínas recém-sintetizadas e as chaperonas. Uma vez que as proteínas tenham atingido a sua conformação correta, elas estão livres para serem exportadas do RE. Caso contrário, um resíduo de glicose é novamente adicionado a estas proteínas fazendo com que elas sejam novamente reconhecidas pelas chaperonas e mantidas no lúmen do RE (D'ALESSIO; CAMELO; PARODI, 2010). Distúrbios na regulação de cálcio impedem a correta ação das chaperonas moleculares cuja função é dependente deste íon (MA; HENDERSHOT, 2004). A hipóxia conduz à produção de espécies reativas de oxigênio, as quais resultam em incorreto dobramento proteico. Além disso, tais moléculas reativas podem também modificar resíduos de cisteína presentes em canais de cálcio associados ao RE, implicando em distúrbios na regulação da concentração de cálcio intracelular, o que também resulta em perturbações no processo de dobramento proteico. As infecções virais, por sua vez, resultam em estresse no RE devido à elevada quantidade de proteínas sintetizadas. Nesse caso, a célula pode ativar mecanismos apoptóticos, como uma maneira de evitar a disseminação do vírus para as células vizinhas (XU; BAILLY-MAITRE; REED, 2005).

A fim de detectar perturbações no funcionamento do RE e, conseqüentemente, no processo de dobramento proteico, o RE apresenta diferentes vias de sinalização intracelulares, denominadas coletivamente como UPR (*unfolded protein response*) (RUTKOWSKI; KAUFMAN, 2004; MORI, 2009). Uma vez ativada, esta via tem como objetivo restabelecer a homeostasia no RE através de mecanismos de controle transcricional e traducional. O controle transcricional atua tanto no incremento da capacidade de dobramento proteico, como no direcionamento de proteínas mal dobradas à degradação. Sob condições de estresse no RE há indução da expressão de chaperonas, promovendo um aumento da capacidade de dobramento de proteínas (WALTER; RON, 2011). Além disso, o incremento da síntese de fosfolípidios leva ao aumento do volume do RE e conseqüente amenização do estresse nesta organela (SCHRÖDER; KAUFMAN, 2006). Outros genes que têm sua expressão aumentada incluem os genes codificantes para componentes da via de degradação de proteínas denominada ERAD (*ER-associated degradation*). Através desta via, as proteínas mal dobradas são translocadas do lúmen do RE para o citosol, ubiquitinadas

e entregues a proteossomos onde serão degradadas (SMITH; PLOEGH; WEISSMAN, 2011).

O controle traducional, por sua vez, é realizado através da atenuação da tradução, reduzindo o influxo de proteínas ao saturado lúmen do RE até que os RNAm produzidos em resposta à ativação da via UPR sejam traduzidos. Esta atenuação da tradução é, portanto, de curta duração, uma vez que a inibição prolongada da tradução normalmente é incompatível com a sobrevivência celular (KIM; XU; REED, 2008). Contudo, caso as medidas de controle transcricional e traducional não sejam suficientes para restaurar a homeostasia no RE e eliminar o excesso de proteínas mal dobradas, a via UPR pode induzir mecanismos apoptóticos (SCHRÖDER, 2008; COSTA; DA ROSA; DE CAMARGO, 2011).

1.1. IDENTIFICAÇÃO E ATIVAÇÃO DOS COMPONENTES DA VIA UPR

A via UPR é ativada sempre que o dobramento de proteínas no RE é comprometido, resultando em um acúmulo de proteínas mal dobradas (WALTER; RON, 2011). Em vertebrados, três proteínas transmembrana residentes no RE são consideradas pontos de regulação da via UPR: IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*), PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) e ATF6 (*activating transcription factor 6*) (COSTA; DA ROSA; DE CAMARGO, 2011). Embora a ativação dessas proteínas desencadeie diferentes mecanismos regulatórios, suas ações convergem para a produção de fatores de transcrição que atuarão sobre promotores de genes alvo da via UPR (WALTER; RON, 2011) (Figura 1).

A ativação dos três componentes da via UPR (IRE1, PERK e ATF6) depende da dissociação da chaperona GRP78/BiP. Em condições normais, GRP78/BiP interage com os três componentes reguladores da via UPR, mantendo-os em um estado inativo. Entretanto, acredita-se que GRP78/BiP tenha preferência pela associação com sítios hidrofóbicos de proteínas mal dobradas. Assim, diante de estresse no RE e consequente acúmulo de proteínas mal dobradas, GRP78/BiP deixa de interagir com os componentes da via UPR deixando-os livres para serem ativados (WALTER; RON, 2011).

Diante de situações de estresse no lúmen do RE, a proteína IRE1 sofre oligomerização seguida de autofosforilação e ativação do seu domínio endoribonuclease. Esse domínio catalisa a remoção de um íntron do RNAm codificante para a proteína XBP-1 (*X-box binding*

protein 1), alterando o seu quadro aberto de leitura. Essa alteração torna o RNAm apto para ser traduzido no fator de transcrição XBP-1. No núcleo, XBP-1 induz a transcrição de chaperonas, incluindo GRP78/BiP (YOSHIDA *et al.*, 2001), enzimas envolvidas com a síntese de lipídios, aumentando o volume do RE, e componentes da via de degradação de proteínas ERAD (WALTER; RON, 2011).

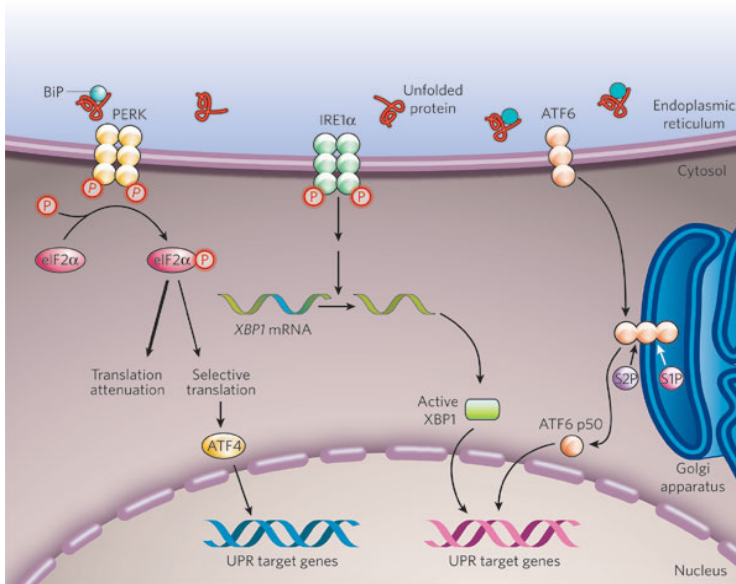


Figura 1. Via UPR (*unfolded protein response*). A via UPR apresenta três pontos de regulação: IRE1, PERK e ATF6, as quais são proteínas transmembrana do RE. Essas proteínas são ativadas diante de condições de estresse no RE e consequente acúmulo de proteínas mal dobradas. A ativação de IRE1 e PERK ocorre por oligomerização, seguida de autofosforilação. Uma vez ativado, PERK leva à fosforilação de eIF2 α , bloqueando a síntese proteica. Entretanto, alguns RNAm são seletivamente traduzidos, como por exemplo, o RNAm codificante para o fator de transcrição ATF4. Diferentemente, IRE1 ao ser ativado remove um íntron do RNAm codificante para XBP-1, produzindo o fator de transcrição XBP-1. ATF6, por sua vez, ao ser ativado é translocado do RE para o aparelho de Golgi onde é clivado, originando o fator de transcrição ATF6. Todos os fatores de transcrição produzidos, XBP-1, ATF4 e ATF6 irão atuar no núcleo, induzindo a expressão de genes alvo da via UPR. Um exemplo é o gene codificante para a chaperona GRP78/BiP, cuja transcrição é aumentada em decorrência da ação dos três fatores de transcrição. Fonte: ZHANG; KAUFMAN, 2008.

Da mesma maneira, sob condições de estresse no RE, PERK sofre oligomerização e autofosforilação, tendo seu domínio quinase ativado. PERK, em sua forma ativa, fosforila a subunidade alfa do fator de iniciação eIF2 (*eukaryotic initiation factor 2*), bloqueando o início da síntese proteica (WALTER; RON, 2011). eIF2 α compõe, juntamente com GTP e o RNAt carregado com a metionina inicial, o complexo ternário que medeia a ligação do RNAt à subunidade ribossomal 40S, iniciando a síntese proteica. A fosforilação de eIF2 α inibe a substituição de GDP por GTP, impedindo a formação do complexo e, conseqüentemente, a síntese proteica (HOLCIK; SONENBERG, 2005). Entretanto, alguns RNAm contendo pequenos quadros abertos de leitura na região 5'-UTR (*5'-untranslated region*) apresentam tradução aumentada em condições onde eIF2 α está fosforilado. Um exemplo é o RNAm codificante para o fator de transcrição ATF4 (*activating transcription factor 4*). Dentre os genes-alvo de ATF4 estão os genes codificantes para o fator de transcrição CHOP (*C/EBP homologous protein*), GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible 34*) e para a chaperona GRP78/BiP. CHOP controla a expressão de genes codificantes para proteínas envolvidas com apoptose, enquanto GADD34 regula negativamente a atividade de PERK por meio da desfosforilação de eIF2 α (WALTER; RON, 2011).

Diante de um acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do RE, a proteína ATF6, por sua vez, é translocada do RE para o aparelho de Golgi, onde é clivada pelas proteases S1P e S2P, produzindo um domínio citoplasmático livre. Este domínio corresponde a um fator de transcrição ativo, cuja atuação no núcleo promove a indução da expressão de determinados genes. Dentre os genes alvo deste fator estão genes codificantes para as chaperonas GRP78/BiP e GRP94 (*glucose-regulated protein 94kDa*) (WALTER; RON, 2011) e para o fator de transcrição XBP-1 (HAZE *et al.*, 1999). Portanto, a ativação da via UPR resulta na produção de três fatores de transcrição: XBP1, ATF4 e ATF6. Estes fatores atuarão sobre promotores de genes alvo da via UPR com o objetivo de restaurar a função do RE. Um dos genes alvo da via UPR e que tem sua síntese aumentada em resposta a ativação dos três componentes da via UPR é o gene codificante para a proteína GRP78/BiP.

1.2. GRP78/BiP

A proteína GRP78/BiP é membro da família HSP70 de chaperonas moleculares (*heat shock protein 70kDa*), embora sua síntese

não seja afetada por condições de choques térmicos (KIM; KIM; LEE, 1987; LI *et al.*, 1994). Apesar de ser tradicionalmente considerada uma chaperona residente no lúmen do RE, alguns estudos detectaram a presença de GRP78/BiP no núcleo e na mitocôndria (MATSUMOTO; HANAWALT, 2000; SUN *et al.*, 2006), no citosol (NI *et al.*, 2009) e na superfície de determinados tipos celulares, particularmente de células cancerosas (ZHANG *et al.*, 2010).

GRP78/BiP está envolvida em diversos processos celulares, incluindo (i) a translocação de polipeptídeos recém-sintetizados através da membrana do RE, (ii) auxílio no processo de dobramento de proteínas, (iii) direcionamento de proteínas mal dobradas para a degradação em proteassomos, (iv) manutenção dos estoques de cálcio no RE e (v) atuação como sensor de estresse, ativando a via UPR (HENDERSHOT, 2004). De modo geral, sua propriedade mais importante é a capacidade de ligar-se a proteínas que exibam trechos mal dobrados (HAAS, 1994). Essa interação de GRP78/BiP com as proteínas não parece ser sequência-específica, mas sim dependente da acessibilidade aos resíduos hidrofóbicos (FLYNN *et al.*, 1991). Adicionalmente, GRP78/BiP é capaz de reconhecer e ligar-se a proteínas que apresentam pontes dissulfeto incompletas (MACHAMER *et al.*, 1990) ou mal glicosiladas (GETHING; SAMBROOK, 1992).

Durante o processo de dobramento proteico, GRP78/BiP interage de maneira transitória com as proteínas recém-sintetizadas. Essa interação ocorre para evitar que sejam formados agregados irreversíveis e para estabilizar a estrutura das proteínas, mantendo-as em um estado competente para serem dobradas e oligomerizadas. Conforme a proteína for adquirindo sua conformação madura, é observada a dissociação de GRP78/BiP. Entretanto, em situações de estresse no RE e consequente comprometimento do processo de dobramento proteico, GRP78/BiP interage de forma mais permanente com as proteínas mal dobradas, mantendo-as no lúmen do RE (GETHING; SAMBROOK, 1992). Essa interação impede que proteínas que não tenham atingido sua conformação madura saiam do RE. Proteínas mal dobradas não serão funcionais, além de apresentarem tendência para a formação de agregados devido à exposição de resíduos hidrofóbicos (HARTL; BRACHER; HAYER-HARTL, 2011). Diante do exposto, o aumento da transcrição de GRP78/BiP é um indicativo de estresse no RE e de que a via UPR está sendo ativada (LEE, 2005).

1.3. VIA UPR E INFECÇÕES VIRAIS

As infecções virais podem culminar na ativação da via UPR por induzirem a célula hospedeira a produzir uma grande quantidade de proteínas virais, o que aumenta a demanda por dobramento proteico e gera, conseqüentemente, estresse no RE (KIM; XU; REED, 2008). Porém, a fim de evitar que a ativação da via UPR impeça a formação de novas partículas virais, os vírus podem modular essa ativação, através do controle dos três componentes regulatórios da via UPR: IRE1, PERK e ATF6 (KEPP *et al.*, 2009). Conseqüentemente, essa modulação irá implicar em alterações na transcrição de GRP78/BiP, uma vez que todos os fatores de transcrição produzidos a partir da ativação da via UPR resultam em regulação positiva da transcrição de GRP78/BiP. Essa modulação é importante para a replicação viral, uma vez que GRP78/BiP atua, principalmente, permitindo o correto dobramento das proteínas virais e, conseqüentemente, sua funcionalidade.

Estudos com células infectadas pelos vírus da hepatite C (HCV), citomegalovírus (CMV), vírus da dengue (DENV), vírus herpes simplex do tipo 1 (HSV-1) e vírus da hepatite B (HBV), por exemplo, demonstraram que estes vírus são capazes de modular a ativação da via UPR. Essa modulação ocorre de maneira a ampliar as vantagens da ativação da via UPR para a replicação viral e evitar os efeitos deletérios dessa ativação.

A proteína não-estrutural NS4B do HCV induz o *splicing* do RNAm codificante para o fator de transcrição XBP-1 e a clivagem de ATF6 em células hepáticas humanas. Entretanto, inibe a transcrição de EDEM (*ER degradation-enhancing alpha-mannosidase-like protein*), o qual é um dos genes alvo do fator de transcrição XBP-1 e compõe a via ERAD de degradação de proteínas (ZHENG *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2009). Dessa forma, esta proteína atua de modo a favorecer a replicação viral, aumentando a capacidade de dobramento proteico no lúmen do RE e impedindo a degradação de proteínas virais. A glicoproteína gB do HSV-1 é capaz de ligar-se a PERK impedindo a sua oligomerização e conseqüente ativação. Dessa forma, esta proteína viral impede a atenuação da tradução mediada por PERK através da fosforilação de eIF2 α (MULVEY; ARIAS; MOHR, 2007). A inibição da tradução não é favorável à replicação viral, uma vez que impede a produção de novas proteínas virais e conseqüente produção de novas partículas virais.

A infecção pelo CMV induz um aumento na expressão dos fatores de transcrição XBP-1 e ATF4. Esse aumento resulta em um acúmulo de GRP78/BiP, o qual é essencial para dar suporte à montagem

de novas partículas virais (ISLER; SKALET; ALWINE, 2005; BUCHKOVICH *et al.*, 2010). Células infectadas *in vitro* com CMV e tratadas com uma toxina capaz de clivar GRP78/BiP não foram capazes de produzir novas partículas virais, demonstrando o importante papel desempenhado por GRP78/BiP na replicação viral (BUCHKOVICH *et al.*, 2008). Além disso, foi verificado que duas proteínas virais, US2 e US11, são capazes de interagir com GRP78/BiP, promovendo a degradação das moléculas de MHC classes I e II. Essa degradação impede o reconhecimento da célula infectada pelos linfócitos T do hospedeiro, mantendo a replicação viral (JOHNSON; HEGDE, 2002; HEGDE *et al.*, 2006).

Dois outros exemplos de proteínas virais que interagem com GRP78/BiP a fim de garantir a montagem de novas partículas virais são as proteínas L do vírus da hepatite B (CHO *et al.*, 2003) e a proteína DENV E do vírus da dengue (LIMJINDAPORN *et al.*, 2009), ambas proteínas de envelope viral. A interação de GRP78/BiP com a proteína L do HBV parece ser importante para torná-lo infeccioso, uma vez que auxilia o correto dobramento da proteína de envelope viral, tornando-a funcional. Em células infectadas pelo vírus da dengue foi demonstrado que a supressão da expressão de GRP78/BiP acarreta em diminuição da produção de novas partículas virais (LIMJINDAPORN *et al.*, 2009). Dessa forma, é possível verificar que os vírus utilizam diferentes mecanismos moleculares para modular a ativação da via UPR em benefício da replicação viral.

1.4. VIA UPR E HIV

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), pertence à família *Retroviridae* e ao gênero *Lentivirus* (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002). Até o momento foram evidenciados dois tipos virais, HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é mais virulento e mais disseminado pelo mundo, enquanto o HIV-2 é encontrado principalmente no oeste da África (RAMBAUT *et al.*, 2004).

Cada partícula viral apresenta um envelope lipoproteico originado da célula hospedeira onde estão ancoradas, além de algumas proteínas do hospedeiro, as glicoproteínas gp120 e gp41. Essas glicoproteínas derivam do precursor gp160, o qual é glicosilado no RE e clivado no aparelho de Golgi (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002). O genoma do HIV constitui-se de duas moléculas idênticas de RNA de fita simples com polaridade positiva. É composto por nove genes

flanqueados por regiões LTR (*long terminal repeat*) as quais, embora não codifiquem proteínas, são importantes no processo de regulação da expressão gênica e durante o processo de integração do genoma viral ao genoma do hospedeiro. Os três principais genes virais *gag*, *pol* e *env* codificam, respectivamente, as proteínas do nucleocapsídeo, as enzimas virais (transcriptase reversa, integrase e protease) e as proteínas de envelope viral (SLEASMAN; GOODENOW, 2003). A enzima transcriptase reversa é responsável pela síntese de DNA dupla fita a partir do RNA viral; a integrase catalisa a ligação deste DNA, de maneira covalente, ao genoma da célula hospedeira; enquanto a protease atua no processo de maturação da partícula viral, clivando poliproteínas virais em proteínas individuais (GANSER-PORNILLOS; YEAGER; SUNDQUIST, 2008).

O HIV infecta células que apresentam o receptor CD4 em sua superfície. Estas células incluem os linfócitos T, monócitos, macrófagos, células dendríticas e da microglia. O processo de infecção é iniciado quando a proteína gp120 do envelope viral liga-se ao receptor celular CD4. Após a ligação, ocorre interação entre os sítios da proteína gp120 com co-receptores de quimiocinas CCR5 ou CXCR4, dependendo da célula alvo e da cepa viral. Como consequência da interação, há a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002).

A infecção pelo HIV causa diminuição no número de células que apresentam o receptor CD4, com destaque para os linfócitos T CD4⁺, resultando em aumento do risco de infecções oportunistas. Atualmente há uma grande variedade de fármacos antirretrovirais disponíveis para o tratamento de indivíduos portadores do HIV, sendo recomendado o emprego combinado de múltiplos fármacos. Dentre os fármacos disponíveis, encontram-se os inibidores da protease, os quais bloqueiam a clivagem das poliproteínas precursoras Gag e Gag-Pol, liberando partículas virais imaturas e, conseqüentemente, não-infecciosas (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002).

Os primeiros estudos relacionando HIV e via UPR focaram na ativação desta via em decorrência da administração dos inibidores da protease. Isso porque, apesar da incorporação dos inibidores da protease à terapia antirretroviral ter reduzido significativamente a morbidade e mortalidade, bem como prolongado a expectativa de vida dos pacientes com HIV, seu uso tem sido associado a distúrbios no metabolismo de lipídios (HUI, 2003; ZHOU *et al.*, 2005). A maioria dos pacientes que faz uso da terapia antirretroviral desenvolve hiperlipidemia, lipodistrofia e resistência à insulina (CARR *et al.*, 1998).

Estudo realizado *in vitro* com macrófagos murinos não infectados demonstrou que os inibidores da protease causaram estresse no RE e consequente ativação da via UPR. A causa de estresse foi, provavelmente, a indução de um acúmulo de colesterol livre intracelular, seguido de depleção dos estoques de cálcio no RE. Esses distúrbios podem explicar a relação entre a administração de inibidores da protease e o aumento do risco de desenvolvimento de aterosclerose e infarto do miocárdio em pacientes HIV positivos sob tratamento com esses fármacos (ZHOU *et al.*, 2005). Distúrbios metabólicos similares foram observados em estudo realizado com hepatócitos murinos não infectados e tratados com inibidores da protease (ZHOU *et al.*, 2006). Adicionalmente, quando células pancreáticas murinas não infectadas foram tratadas com inibidores de protease observou-se distúrbios no metabolismo da glicose, a qual também pode ser causa de estresse no RE (KOSTER *et al.*, 2003). Tomados juntos, esses resultados demonstram que a administração de inibidores da protease resulta em estresse no RE e consequente ativação da via UPR em diferentes tipos celulares.

São muito escassos, porém, os trabalhos relacionando o efeito da infecção pelo HIV na ativação da via UPR, bem como estudos sobre o efeito da infecção pelo HIV somado à presença dos inibidores da protease na ativação desta via. As primeiras evidências da possível modulação da via UPR pelo HIV-1 são provenientes de estudos sobre a interação da proteína viral Tat, codificada pelo gene *tat*, com uma proteína de função semelhante à de PERK, denominada PKR (*RNA-dependent protein kinase*) (CLEMENS *et al.*, 1994). A proteína Tat contribui para a replicação viral, uma vez que estimula a transcrição do DNA proviral, transporte do RNAm para o citoplasma e a sua posterior tradução (MILLER; SARVER, 1997). Por outro lado, a proteína PKR desempenha importante papel antiviral, visto que promove a fosforilação de eIF2 α e, conseqüentemente, bloqueia a síntese proteica. A fim de evitar que a ativação de PKR impeça a formação de novas partículas virais, o HIV-1 parece modular essa resposta através da interação de Tat com PKR. Tat atua como substrato da enzima, competindo com o fator eIF2 α pelo sítio de ligação, resultando na inibição do bloqueio à tradução (CLEMENS *et al.*, 1994; MCMILLAN *et al.*, 1995; BRAND; KOBAYASHI; MATHEWS, 1997; CAI *et al.* 2000; ENDO-MUNOZ *et al.*, 2005).

Outros estudos sugerem a importância de GRP78/BiP para o correto dobramento da proteína gp160, codificada pelo gene *env* (EARL; MOSS; DOMS, 1991; KNARR *et al.*, 1999; LAND;

BRAAKMAN, 2001). Essa proteína é precursora das glicoproteínas de envelope viral gp120 e gp41. Apenas com a presença dessas glicoproteínas o vírus é considerado infeccioso (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002). Recentemente foi demonstrado o aumento da expressão de ATF4 durante a infecção aguda pelo HIV-1. Esse aumento implica em maior eficiência da replicação viral, uma vez que ATF4 é capaz de interagir com a proteína viral Tat. Além disso, ATF4 mostrou-se capaz de reativar a replicação do HIV em células de linhagem monocítica (CASELLI *et al.*, 2012).

Estudo recente realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada da UFSC avaliou o efeito da infecção pelo HIV na ativação da via UPR em linfócitos B, linfócitos T CD4⁺ e monócitos provenientes de indivíduos HIV negativos e HIV positivos sob diferentes esquemas terapêuticos através da metodologia de Western Blot. Nesse estudo foi verificado um aumento da expressão de GRP78/BiP em linfócitos B oriundos de indivíduos HIV positivos quando comparados aos indivíduos HIV negativos. A forma fosforilada de eIF2 α foi detectada em linfócitos B e linfócitos T CD4⁺ provenientes de indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral, demonstrando que nestes indivíduos a via de sinalização desencadeada por PERK estava ativada. IRE1 fosforilado foi detectado em linfócitos B e linfócitos T CD4⁺ provenientes de indivíduos HIV negativos e HIV positivos, porém sua expressão foi aumentada em linfócitos B oriundos de indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor da protease. Adicionalmente, foi verificado um aumento da expressão de IRE1 fosforilado em linfócitos T CD4⁺ provenientes de indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor da protease. Por fim, ATF6 em sua forma clivada foi detectado em todos os tipos celulares avaliados provenientes de indivíduos HIV positivos (BORSA, 2012). Desse estudo pode-se concluir que a ativação da via de sinalização iniciada pelo componente regulatório ATF6 e o aumento da expressão de GRP78/BiP são influenciados pela infecção pelo HIV, mas não pelo tratamento antirretroviral utilizado. Por outro lado, a ativação das vias de sinalização iniciadas por PERK e IRE1 foi dependente da infecção pelo HIV e pelo esquema terapêutico utilizado.

Diante do exposto, o presente trabalho justificou-se pela necessidade da busca por novos alvos terapêuticos para o tratamento da infecção pelo HIV-1. A escolha do vírus foi realizada com base na sua alta virulência e disseminação, além de ser o responsável pela pandemia de Aids, doença com a qual 35 milhões de pessoas convivem no mundo (WHO, 2013). A utilização da via UPR como um potencial alvo

terapêutico decorre do fato de sua ativação ser uma resposta natural da célula ao estresse no RE, que pode ser resultado de infecção viral. Uma vez que a ativação da via UPR implica na atenuação da síntese proteica e pode levar à ativação de mecanismos apoptóticos, os vírus podem modular sua ativação. Essa modulação visa garantir que a ativação da via UPR não impeça a replicação viral, o que sugere a regulação da via UPR como um potencial alvo terapêutico. Adicionalmente, os diferentes tratamentos nos quais os pacientes HIV positivos estão submetidos podem interferir no processo de ativação da via UPR. Entretanto, ainda são escassos os relatos do efeito da infecção pelo HIV-1, bem como da influência dos fármacos antirretrovirais, sobre a ativação da via UPR. Também é importante destacar que os poucos trabalhos publicados são restritos a estudos *in vitro*. Em contraste, no presente estudo foram utilizadas células oriundas de indivíduos HIV positivos sob diferentes esquemas terapêuticos, permitindo a ampliação do conhecimento acerca da via UPR. Por fim, a escolha da avaliação da transcrição da chaperona GRP78/BiP para verificar o impacto da infecção bem como do tratamento antirretroviral na ativação da via UPR justificou-se pelo fato do aumento transcricional de GRP78/BiP ser um indicativo de estresse no RE e de ativação da via UPR. Dessa forma, embora tenham sido obtidos dados sobre a tradução de GRP78/BiP em estudo anterior realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada, faz-se necessária a avaliação da transcrição desta chaperona, uma vez que a ativação da via UPR resulta na produção de fatores de transcrição, os quais agem no promotor de GRP78/BiP, induzindo a sua transcrição. Adicionalmente, foi preciso verificar se, a ocorrência de um aumento transcricional de GRP78/BiP em decorrência da infecção pelo HIV e/ou tratamento antirretroviral, é correlacionado a um aumento traducional desta chaperona.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a transcrição da chaperona GRP78/BiP em células provenientes de indivíduos HIV positivos submetidos a diferentes esquemas terapêuticos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Padronizar a metodologia de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para emprego na avaliação da transcrição de GRP78/BiP;

b) Avaliar possíveis diferenças na transcrição de GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺ e monócitos oriundos de indivíduos HIV negativos e HIV positivos;

c) Correlacionar a terapia antirretroviral utilizada e o padrão de transcrição de GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺ e monócitos oriundos de indivíduos HIV positivos;

d) Correlacionar os níveis de RNAm e proteína de GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺ e monócitos oriundos de indivíduos HIV negativos e HIV positivos sob diferentes esquemas terapêuticos.

3. METODOLOGIA

A avaliação do efeito da infecção pelo HIV sobre a ativação da via UPR constitui uma das linhas de pesquisas do Laboratório de Imunologia Aplicada de modo que as etapas 3.1, 3.2 e 3.3 descritas abaixo foram realizadas em estudos anteriores (BORSA, 2012; TONELLO, 2012), estando aqui descritas para facilitar a compreensão do presente estudo.

3.1. POPULAÇÃO DE ESTUDO

No período de abril de 2011 a abril de 2012 foram recrutados 35 indivíduos, os quais foram divididos em 4 grupos. O primeiro grupo corresponde ao grupo controle (C), sendo composto por 10 voluntários, HIV negativos e doadores de aférese. Os três demais grupos são compostos por indivíduos HIV positivos, assim divididos: (i) 7 indivíduos HIV positivos sem tratamento (ST); (ii) 9 indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor da protease (TSI); e (iii) 9 indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor da protease (TCI).

Os indivíduos HIV negativos foram recrutados no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC, Florianópolis-SC) e os voluntários HIV positivos foram recrutados no Hospital Regional Dr. Homero de Miranda Gomes (São José-SC) e no Centro de Testagem e Aconselhamento (CTA, São José-SC). Todos os indivíduos possuíam idade superior a 18 anos e foi considerado como critério de exclusão a infecção ativa por HCV, CMV, HSV-1 ou enterovírus, uma vez que a infecção por estes vírus leva à ativação da via UPR (ISLER; SKALET; ALWINE, 2005; MULVEY; ARIAS; MOHR, 2007; CHAN; EGAN, 2009; JHENG *et al.*, 2010). Os voluntários que aceitaram participar do estudo foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1). Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (processo 1056/2010).

3.2. SEPARAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES CELULARES

De cada voluntário foram coletados 30 ml de sangue em tubos Vacutainer® (BD Biosciences) contendo o anticoagulante EDTA. Este volume foi dividido em três frações de 10 ml, a partir das quais foram

isoladas subpopulações de linfócitos B (não avaliadas neste estudo), linfócitos T CD4⁺ e monócitos através da utilização dos kits *RosetteSep Human B Cell Enrichment Cocktail*, *RosetteSep Human CD4⁺ T Cell Enrichment Cocktail*, e *RosetteSep Human Monocyte Cell Enrichment Cocktail* (StemCell Technologies), respectivamente. Para tanto, as amostras de 10 ml de sangue foram homogeneizadas com 500 µl da solução proveniente do respectivo *kit* e incubadas por 20 min, à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram diluídas em 10 ml de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4) suplementados com 2% de soro fetal bovino (SFB), seguido de leve homogeneização. O volume total de cada amostra foi distribuído em 3 tubos contendo 4 ml de Ficoll PaqueTM Plus (StemCell Technologies), os quais foram centrifugados por 20 min a 1200 x g a 25°C. Após a centrifugação, as células presentes na interface Ficoll-plasma foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS acrescido de 2% de SFB, através de centrifugação por 5 min, a 500 x g, a 25°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi mantido no gelo. As células isoladas foram contadas em câmara de Neubauer e a viabilidade celular foi avaliada através de coloração com azul de Trypan 0,02% (Invitrogen). A pureza das subpopulações celulares obtidas foi verificada através de citometria de fluxo, utilizando-se anticorpos conjugados a fluoróforos e específicos para determinados marcadores de superfície celular, característicos para cada subpopulação celular avaliada. Para a amostra de linfócitos T CD4⁺ foi avaliada a presença concomitante dos marcadores CD3 e CD4 e para a amostra de monócitos foi avaliada a presença concomitante dos marcadores de superfície celular CD14 e CD4.

3.3. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL

Com o objetivo de extrair o RNA total das subpopulações celulares isoladas foi utilizado o *kit* PARIS – *Protein and RNA Isolation System* (Ambion, Life Technologies). Primeiramente, as células foram lisadas através da adição de 300 µl de *cell disruption buffer* para cada 1x10⁶ células, seguido de pipetagem vigorosa e incubação em gelo por 10 min. Do volume total de lisado foram utilizados 100 µl para a extração de RNA, sendo o restante armazenado para avaliações proteicas através da metodologia de Western Blot (BORSA, 2012).

Os 100 µl do lisado de cada uma das subpopulações celulares isoladas foram transferidos para um tubo contendo 100 µl de 2X *lysis/binding solution*, seguido de adição de 100 µl de etanol 100%, à

temperatura ambiente. As amostras foram, então, transferidas para colunas de purificação, disponibilizadas pelo *kit*, e centrifugadas a 11000 x g por 1 min à temperatura ambiente. O volume de amostra que atravessou o filtro foi descartado e a coluna foi lavada com 700 µl de *wash solution 1* através de centrifugação por 1 min a 11000 x g, descartando-se o conteúdo que a atravessasse. Em seguida, a coluna foi novamente lavada 2 vezes através da adição de 500 µl da *wash solution 2/3* e centrifugação a 11000 x g por 1 min. Após as lavagens, o RNA total foi eluído da coluna pela adição de 50 µl de *elution solution*, pré-aquecida a 95°C e centrifugação a 11000 x g por 30 s. Em seguida, foram adicionados 10 µl da mesma solução, pré-aquecida a 95°C, e o tubo foi submetido à centrifugação a 11000 x g por 30 s. O RNA total extraído foi armazenado a -80°C.

3.4. TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE RNA COM DNASE

As amostras de RNA (60µl) foram tratadas com DNase I (Invitrogen) através da adição de 1 µl de 10x *DNase I reaction buffer*, 1 µl de DNase I Amp Grade 1 U/µl e 8 µl de água livre de nucleases (Qiagen), seguida de incubação por 15 min à temperatura ambiente. A enzima DNase foi inativada pela adição de 1 µl de 25mM *EDTA solution* e incubação a 65°C em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) durante 10 min. A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro (Nanovue, GE Healthcare) no dia posterior ao tratamento com DNase.

3.5. TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

A fim de realizar a qPCR, as amostras de RNA foram convertidas a DNA complementar (cDNA). A transcrição reversa foi realizada a partir de uma concentração fixa de 40 ng de RNA, utilizando-se o *kit Superscript III first strand* (Invitrogen). A reação consistiu em dois passos, sendo o primeiro o anelamento de pequenas sequências randômicas de 6 nucleotídeos ao RNA, as quais atuaram como iniciadores para a enzima transcriptase reversa, enquanto o segundo passo consistiu na adição da enzima transcriptase reversa. Para tanto, foram adicionados 40 ng de RNA, 1 µl da solução contendo os hexâmeros randômicos, 1 µl de *annealing buffer*, e água livre de nucleases (Qiagen) para completar um volume final de 8 µl. As amostras foram então incubadas a 65°C em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) por 5 min e transferidas imediatamente para o

gelo, onde foram mantidas por no mínimo 1 min. Posteriormente foram adicionados 10 µl de *2X first-strand reaction mix* e 2 µl de *SuperScript III/RNaseOUT enzyme mix*, totalizando um volume final de reação de 20 µl. As amostras foram então incubadas por 10 min a 25°C, seguido por 50 min a 50°C. A reação foi encerrada através da inativação da enzima transcriptase reversa pelo aquecimento por 5 min a 85°C. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C.

Para cada reação de transcrição reversa, dois controles negativos foram preparados: i) controle sem RNA e ii) controle sem a enzima transcriptase reversa. O primeiro tem por objetivo verificar uma possível contaminação dos reagentes ao passo que o segundo verifica a presença de contaminação da amostra de RNA por DNA genômico. Em ambos, os componentes excluídos foram substituídos por água, a fim de manter o volume final de 20 µl.

3.6. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

A transcrição de GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺ e monócitos oriundos de indivíduos HIV negativos e HIV positivos sob diferentes esquemas terapêuticos foi avaliada através da metodologia de qPCR. Os níveis de RNAm de GRP78/BiP foram quantificados com relação aos níveis de RNAm dos genes de referência GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e β 2M (*beta-2-microglobulin*). Ambos os genes são constitutivamente expressos nos diferentes tipos celulares: GAPDH codifica para uma enzima importante para o metabolismo de carboidratos, a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, enquanto o gene β 2M codifica para uma proteína que compõe a estrutura do MHC de classe I, o qual está presente em células nucleadas (NCBI, 2014a).

A escolha dos genes de referência foi baseada no fato de que GAPDH e β 2M são genes estáveis em leucócitos (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). A sequência dos iniciadores utilizados neste trabalho foi obtida de estudos previamente publicados (Tabela 1) e sua especificidade foi testada através de alinhamento utilizando a ferramenta BLAST (NCBI, 2014b) e por observação da curva de dissociação. Todos os pares de iniciadores utilizados englobavam pelo menos um íntron.

A qPCR foi realizada no aparelho *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Cada reação de 25 µl continha 12,5 µl de *SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)*, 1 µl do iniciador senso (10µM), 1 µl do iniciador antissenso (10µM), 2,5 µl de cDNA e 8

µl de água livre de nucleases (Qiagen). As reações foram realizadas em placas *MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plate 0,1ml* (Applied Biosystems), as quais foram seladas com *Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems) e centrifugadas por 2 min a 300 x g. A qPCR foi realizada sob as seguintes condições: 95°C por 10 min; 40 ciclos de 95°C por 15 s e 62,5°C por 1 min com captura de fluorescência ao final de cada ciclo. Após os 40 ciclos foi avaliada a temperatura de dissociação, cujas condições foram: 95°C por 15 s; 60°C por 1 min e leitura a cada 15 s até ser atingida a temperatura de 95°C.

Tabela 01. Sequências de iniciadores utilizados nas reações em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR).

Iniciador	Sequência senso (5'-3')	Sequência antissenso (5'-3')	Produto (pb)
BiP ¹	CGGGCAAAGATGTCAGGAAAG	TTCTGGACGGGCTTCATAGTAGA	211
β2M ²	ATGAGTATGCCTGCCGTGTGA	GGCATCTTCAAACCTCCATG	101
GAPDH ¹	GAGCCACATCGCTCAGACAC	CATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG	150

Fonte: ¹Hiramatsu; Joseph; Lin, 2011; ²Gonzalez, *et al.*, 2008.

Em cada ensaio de qPCR foram incluídos três controles negativos: i) controle sem RNA, ii) controle sem a enzima transcriptase reversa, e iii) controle sem cDNA. Adicionalmente, foi incluído, em triplicata, um controle positivo, o qual correspondia a um ponto da curva padrão confeccionada a partir de diluições seriadas de RNA total de referência humano (Clontech). A adição deste ponto permitiu o cálculo do coeficiente de variação dos ensaios realizados. Este foi calculado dividindo-se o desvio padrão pela média dos valores de ciclos quantitativos (Cqs) obtidos para este ponto em cada um dos ensaios. Adicionalmente aos controles, as amostras foram avaliadas em triplicata para todos os genes avaliados.

A curva padrão foi preparada a partir das seguintes concentrações de RNA total de referência humano: 125 ng/µl, 12,5 ng/µl, 1,25 ng/µl, 0,125 ng/µl, 0,0125 ng/µl. O RNA foi reversamente transcrito a cDNA e submetido a qPCR. Os valores de Cqs obtidos foram plotados com o log da concentração de RNA de referência. Foram feitas três curvas padrão, uma para cada um dos genes avaliados. A partir destas curvas foi possível calcular a eficiência (E) de amplificação de cada um dos iniciadores utilizados através da inclinação da reta, onde $E = 10^{-1/\text{inclinação da reta}} - 1$. O valor de eficiência deve variar entre 90 e 110% (APPLIED BIOSYSTEMS, 2011). Em seguida, as eficiências de amplificação foram comparadas através de plotagem dos valores obtidos pela

subtração dos Cq médios de cada dupla de iniciadores com o log da concentração de RNA de referência. As eficiências são consideradas comparáveis quando a inclinação da reta é menor que 0,1. A apresentação de eficiências comparáveis entre os diferentes genes avaliados permitiu a utilização do método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Cq}$ para quantificar a transcrição de GRP78/BiP com relação aos genes de referência $\beta 2M$ e GAPDH (LIVAK; SCHIMITTGEN, 2001; LARIONOV; KRAUSE; MILLER, 2005; APPLIED BIOSYSTEMS, 2011). Os gráficos foram produzidos no programa Microsoft Excel 2007.

O valor de *threshold* foi estabelecido manualmente para 0.027955 para todos os tipos celulares e genes avaliados neste estudo. Para obtenção deste valor, a curva de amplificação foi dividida em 4 partes, sendo observada a $\frac{3}{4}$ parte desta curva. O valor de 0.027955 é o valor intermediário desta parte. Os valores de Cq foram então importados para o programa Microsoft Excel 2007, onde foram convertidos a valores de expressão relativa através da aplicação do método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHIMITTGEN, 2001). Primeiramente, os *outliers* foram excluídos usando o software *RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5* (Qiagen, 2014). Em seguida, os valores de Cq de GRP78/BiP foram normalizados usando ambos os genes de referência, $\beta 2M$ e GAPDH. Para tanto, foi realizada uma subtração dos valores de Cq de GRP78/BiP com a média dos valores de Cq dos genes de referência. Este valor normalizado corresponde ao ΔCq . Em seguida, foi obtido o valor de $\Delta\Delta Cq$ a partir da fórmula $2^{-\Delta Cq}$. Os valores de *fold change* individuais foram calculados a partir da divisão do valor de $\Delta\Delta Cq$ de cada indivíduo pela média geométrica do $\Delta\Delta Cq$ do grupo (C ou ST ou TCI ou TSI) a que este indivíduo pertencia. O valor de *fold change* para cada um dos grupos analisados (C, ST, TCI, TSI) foi calculado através da divisão da média geométrica do $\Delta\Delta Cq$ do respectivo grupo com a média geométrica do $\Delta\Delta Cq$ do grupo controle (C). Os valores de *fold change* individuais foram analisados quanto à sua normalidade utilizando-se o teste de normalidade Shapiro-Wilk, disponível no programa R, versão 3.0.

Diferenças nos níveis de transcrição de GRP78/BiP entre os diferentes grupos foram investigadas com o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas Dunn. A escolha do teste foi devido ao fato de que os requisitos necessários para a utilização do teste paramétrico ANOVA (ausência de *outliers* e distribuição normal dos dados) foram violados. Dessa forma, foi utilizada a versão não-paramétrica deste teste, o teste Kruskal-Wallis.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas bem como os gráficos foram realizados utilizando-se o software *GraphPad Prism*, versão 5.01.

Os níveis da proteína GRP78/BiP em indivíduos HIV negativos e HIV positivos sob diferentes esquemas terapêuticos foram avaliados em trabalho anterior realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada da UFSC (BORSA, 2012). A correlação entre os níveis de RNAm de GRP78/BiP e da proteína GRP78/BiP foi analisada através do teste não paramétrico *Spearman's rank*. Neste teste foram comparadas as médias de *fold change* para cada um dos grupos analisados com as médias de intensidade das bandas obtidas no Western Blot para cada um dos grupos analisados, ambos em comparação ao grupo controle. Os dados referentes à proteína GRP78/BiP foram normalizados com a utilização da proteína de referência β -actina. As análises estatísticas e os gráficos foram realizados utilizando-se o software *GraphPad Prism*, versão 5.01.

4. RESULTADOS

A transcrição de GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺ e monócitos oriundos de indivíduos HIV negativos e HIV positivos sob diferentes esquemas terapêuticos foi avaliada através da metodologia de RT-qPCR, fazendo-se uso de iniciadores específicos para GRP78/BiP. A avaliação dos níveis de RNAm de GRP78/BiP foi realizada através da mensuração destes em relação aos níveis de RNAm dos genes de referência β 2M e GAPDH, cuja expressão é constitutiva.

Amostras de sangue total foram coletadas de 35 indivíduos, os quais foram divididos em quatro grupos. O primeiro grupo foi composto por 10 indivíduos HIV negativos, que representavam o grupo controle (C). O segundo grupo foi composto por 7 indivíduos HIV positivos, que não recebiam tratamento antirretroviral (ST). O terceiro grupo foi formado por 9 indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor da protease (TSI). Por fim, o quarto grupo foi composto por 9 indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor da protease (TCI).

Do sangue total destes indivíduos, foram separadas as subpopulações celulares de linfócitos T CD4⁺, monócitos e linfócitos B. Estes últimos não foram utilizados no presente trabalho por não serem passíveis de infecção pelo HIV devido a ausência do receptor CD4. A avaliação da pureza das amostras foi realizada em estudo anterior, obtendo-se para a amostra de linfócitos T CD4⁺ pureza de 93,4% e para a amostra de monócitos pureza de 71,2% (BORSA, 2012). A partir das subpopulações celulares de linfócitos T CD4⁺ e monócitos (1×10^6 células), o RNA total foi extraído e quantificado. Para ambos os tipos celulares, a quantidade de RNA total obtida foi muito variável (tabela 2).

Tabela 2. Variação das concentrações de RNA total extraído de linfócitos T CD4⁺ e monócitos.

	C	ST	TCI	TSI
<i>Linfócitos T</i>	168ng-	288 ng-	480 ng-	372 ng-
<i>CD4+</i>	2,52 μ g	2,33 μ g	1,32 μ g	5,68 μ g
<i>Monócitos</i>	432ng-	588 ng-	318 ng-	498 ng-
	2,11 μ g	3,86 μ g	3,43 μ g	2,71 μ g

A especificidade dos iniciadores utilizados foi confirmada por meio de anelamento utilizando o programa BLAST e pela presença de um único pico na curva de dissociação (Figura 2). Adicionalmente, não

foram verificados dímeros de iniciadores pela análise da curva dissociação. A análise da curva padrão demonstrou que todos os iniciadores utilizados apresentaram boas eficiências de amplificação. A curva padrão para o iniciador GRP78/BiP apresentou uma inclinação da reta de -3,366 , e portanto, de acordo com a fórmula $E=10^{-1/\text{inclinação da reta}}$ - 1, este iniciador apresentou uma eficiência de amplificação de 98% (Figura 3). Para o iniciador GAPDH, essa inclinação foi de -3,406 e a eficiência de amplificação obtida a partir desta inclinação foi de 96,3% (Figura 3). Por fim, a curva padrão do iniciador β 2M apresentou uma inclinação da reta de -3,291 e, portanto, este iniciador apresentou eficiência de amplificação de 100,9% (Figura 3). Dessa forma, todos os iniciadores apresentaram eficiências dentro do intervalo recomendado, ou seja, eficiências entre 90% e 110% (APPLIED BIOSYSTEMS, 2011).

Análises posteriores comparando as eficiências dos iniciadores demonstraram que estes apresentam eficiências comparáveis, com valores de inclinação da reta inferiores a 0,1 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2011) (Figura 4). A comparação entre as eficiências de amplificação dos iniciadores GRP78/BiP e GAPDH resultou em uma inclinação da reta de 0,04. A comparação das eficiências de amplificação da dupla de iniciadores GRP78/BiP e β 2M resultou em uma inclinação da reta de 0,074. Por fim, a comparação de eficiência dos iniciadores β 2M e GAPDH resultou em uma inclinação da reta de 0,115. Embora esta última comparação não tenha apresentado uma inclinação da reta inferior a 0,1, seu valor foi próximo ao valor exigido. Adicionalmente, a comparação das eficiências entre ambos os genes de referência não foi considerada relevante para este trabalho, uma vez que a transcrição de GRP78/BiP foi comparada com a transcrição dos genes β 2M e GAPDH e não foi feita comparação direta entre a transcrição do genes β 2M e GAPDH. Uma vez que os iniciadores apresentaram boas eficiências de amplificação e sendo estas comparáveis, foram atendidas todas as exigências para o uso do método $2^{-\Delta\Delta Cq}$, podendo este ser usado para as análises de transcrição de GRP78/BiP.

A ausência de amplificação nos controles negativos presentes em todos os ensaios de qPCR realizados demonstra que não houveram problemas de contaminação durante estes experimentos. Análise do coeficiente de variação entre os ensaios de qPCR realizados resultou em variação inferior a 10%, demonstrando que as variações nos níveis de RNAm não foram devidas a variações intrínsecas à técnica empregada.

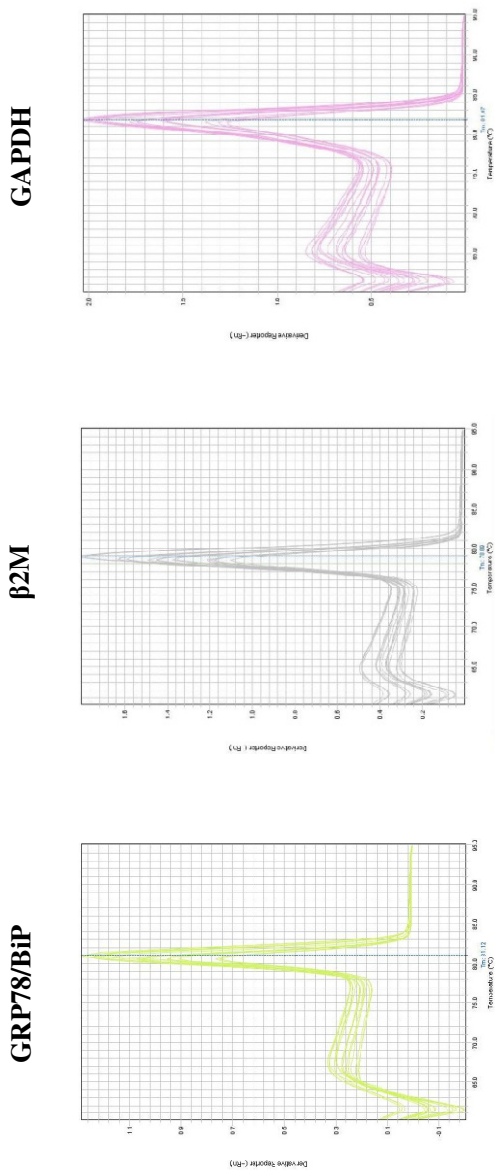


Figura 2. Curvas de dissociação dos iniciadores GRP78/BiP, β 2M e GAPDH. No eixo x é apresentada a temperatura ($^{\circ}$ C) e no eixo y é apresentada a primeira derivada negativa da fluorescência normalizada pelo *reporter* (*SYBR Green*) durante a amplificação da PCR ($-R_n$).

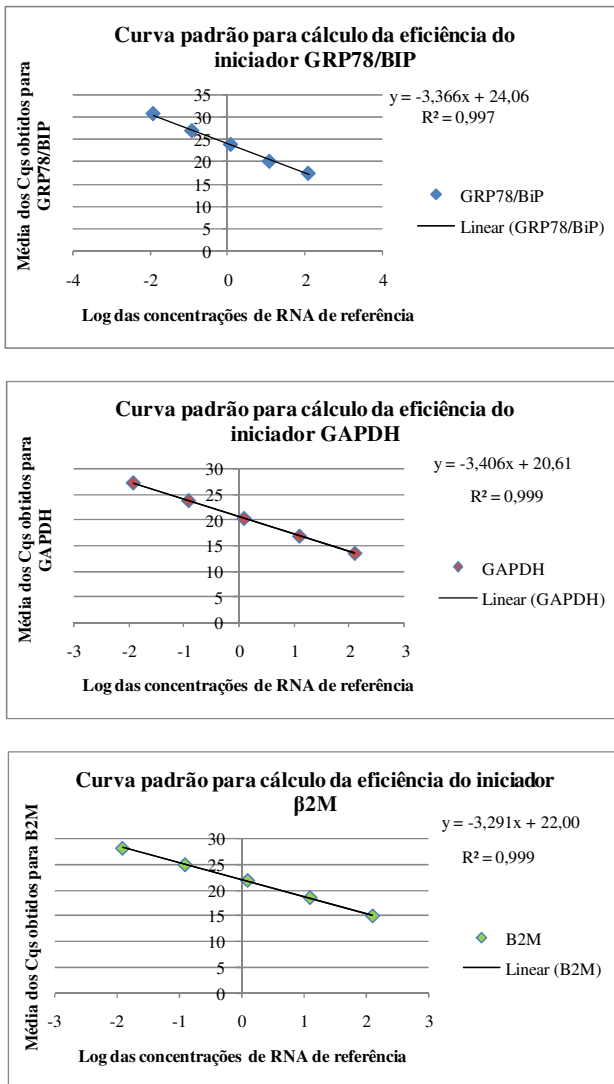


Figura 3. Curva padrão para avaliação da eficiência de amplificação dos iniciadores GRP78/BiP, GAPDH e β2M. No eixo x são apresentadas as 5 diferentes concentrações de RNA de referência, em escala logarítmica, utilizadas para a confecção da curva padrão. No eixo y são apresentadas as médias de ciclo quantitativos (Cq) obtidos, uma vez que cada amostra foi feita em triplicata. A eficiência de amplificação do iniciador foi calculada através da fórmula $E = 10^{-1/\text{inclinação da reta}} - 1$.

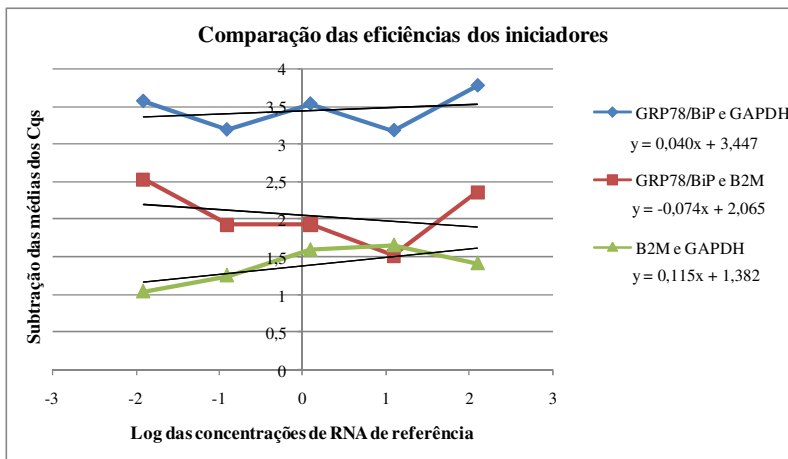


Figura 4. Comparação das eficiências de amplificação dos iniciadores GRP78/BiP, GAPDH e β 2M. No eixo x são apresentadas, em escala logarítmica, as 5 diferentes concentrações de RNA de referência utilizadas para a confecção da curva padrão. No eixo y são apresentados os valores obtidos após a subtração da média de ciclos quantitativos (Cqs) para cada dupla de iniciadores.

A análise dos Cqs obtidos para cada uma das amostras testadas no software *RT² Profiler PCR Array Data Analysis* resultou na exclusão de 5 indivíduos nas amostras de linfócitos T CD4⁺ e 8 indivíduos nas amostras de monócitos. Dos cinco indivíduos removidos das amostras linfócitos CD4⁺, 1 era pertencente ao grupo C, 1 ao grupo TCI e 3 pertenciam ao grupo TSI. Nas amostras de monócitos, foram consideradas *outliers* 1 amostra do grupo C, 1 amostra do grupo ST, 2 amostras do grupo TCI e 4 do grupo TSI. Uma vez tendo removido os *outliers*, a análise de normalidade dos dados demonstrou que nos linfócitos T CD4⁺, apenas o grupo TSI apresentou dados com distribuição normal ($p=0,06$). Por outro lado, em monócitos, nenhum grupo apresentou valores cuja distribuição é normal.

A análise da quantificação relativa dos níveis de RNAm de GRP78/BiP em comparação aos níveis de RNAm dos genes de referência GAPDH e β 2M demonstrou um aumento da transcrição de GRP78/BiP nos indivíduos HIV positivos quando comparados ao grupo controle em ambos os tipos celulares avaliados (Figura 5). Entretanto, esse aumento somente foi considerado estatisticamente significativo em linfócitos T CD4⁺ ($p=0,0003$). Adicionalmente, foi possível verificar

uma transcrição diferencial de GRP78/BiP nos diferentes esquemas terapêuticos a que os indivíduos HIV positivos estão submetidos. Os linfócitos T CD4⁺ oriundos de indivíduos HIV positivos sem tratamento antirretroviral apresentaram transcrição de GRP78/BiP 10,5 vezes maior do que aqueles oriundos de indivíduos HIV negativos. Esta diferença foi considerada significativa, uma vez que foi obtido um valor de p entre 0,01 e 0,05. Em linfócitos T CD4⁺ provenientes de indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor da protease este aumento foi de 26,2 vezes, em relação ao grupo controle. Em indivíduos tratados sem inibidor da protease este aumento foi de 43,5 vezes, quando comparado ao grupo controle. As análises estatísticas demonstraram que estas duas últimas diferenças foram significativas, com valores de p variando entre 0,001 e 0,01. Análise das diferenças observadas entre os grupos compostos por indivíduos HIV positivos demonstrou que tais diferenças não são estatisticamente significativas (a saber, comparação ST contra TCI; ST contra TSI; e TCI contra TSI).

Nas amostras de monócitos foi observada a mesma tendência de aumento na transcrição de GRP78/BiP nos indivíduos HIV positivos quando comparados com o grupo controle, composto por indivíduos HIV negativos (Figura 5). Porém, esta diferença não foi considerada estatisticamente significativa, uma vez que $p > 0,05$. Nestas amostras, foi verificado um grande aumento na transcrição de GRP78/BiP no grupo de indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor da protease, compatível com o que foi verificado em linfócitos T CD4⁺. Nos indivíduos HIV positivos sem tratamento houve um aumento de 5,8 vezes nos níveis de RNAm de GRP78/BiP em relação ao grupo controle. Nos indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor da protease este aumento foi de 5,25 vezes. Por fim, nos indivíduos tratados sem inibidor da protease houve um aumento de 14,2 vezes na transcrição de GRP78/BiP. Da mesma forma que em linfócitos T CD4⁺, as diferenças verificadas entre os grupos compostos por indivíduos HIV positivos nas amostras de monócitos não foram consideradas estatisticamente significativas.

A análise de correlação entre os níveis de RNAm de GRP78/BiP e os níveis proteicos de GRP78/BiP, estes últimos obtidos por Borsa (2012), demonstrou uma correlação positiva em ambos os tipos celulares, linfócitos T CD4⁺ e monócitos (Figura 6). Essa correlação foi considerada estatisticamente significativa, uma vez que em linfócitos T CD4⁺ foi obtido um valor de $p < 0,0001$ e em monócitos um valor de $p = 0,0261$. A correlação foi demonstrada ser mais forte em linfócitos T CD4⁺ ($r = 0,9930$) do que em monócitos ($r = 0,6364$). Em linfócitos T

CD4⁺, aumentos nos níveis de RNAm de GRP78/BiP foram acompanhados por aumentos nos níveis proteicos de GRP78/BiP em todos os grupos avaliados. Em monócitos, essa correlação foi mais evidente no grupo TSI do que nos demais grupos.

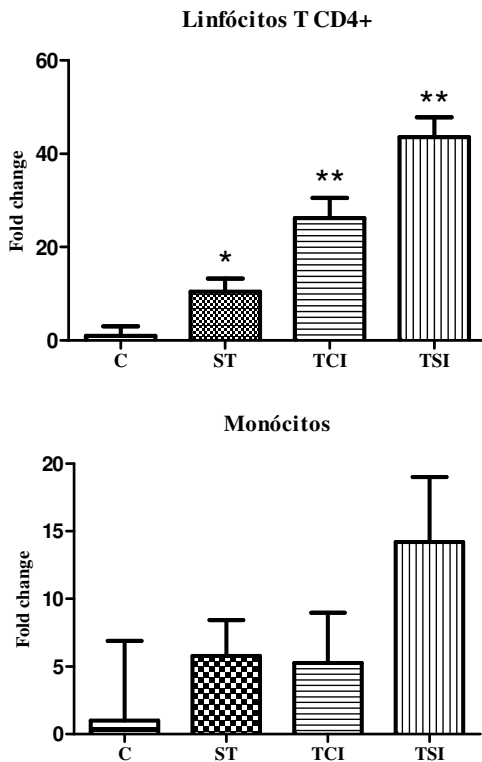


Figura 5. Níveis de RNAm de GRP78/BiP em relação aos níveis de RNAm dos genes de referência GAPDH e β 2M em linfócitos T CD4⁺ e em monócitos. Os resultados estão apresentados como médias \pm desvio padrão e estão expressos como alterações nos níveis de RNAm de GRP78/BiP em indivíduos HIV positivos quando comparadas ao grupo controle. Um asterisco representa valor de p entre 0,01 e 0,05; dois asteriscos representam valores de p entre 0,001 e 0,01. C: indivíduos HIV negativos; ST: indivíduos HIV positivos sem tratamento antirretroviral; TCI: indivíduos HIV positivos com tratamento antirretroviral com inibidor da protease; TSI: indivíduos positivos com tratamento antirretroviral sem inibidor da protease.

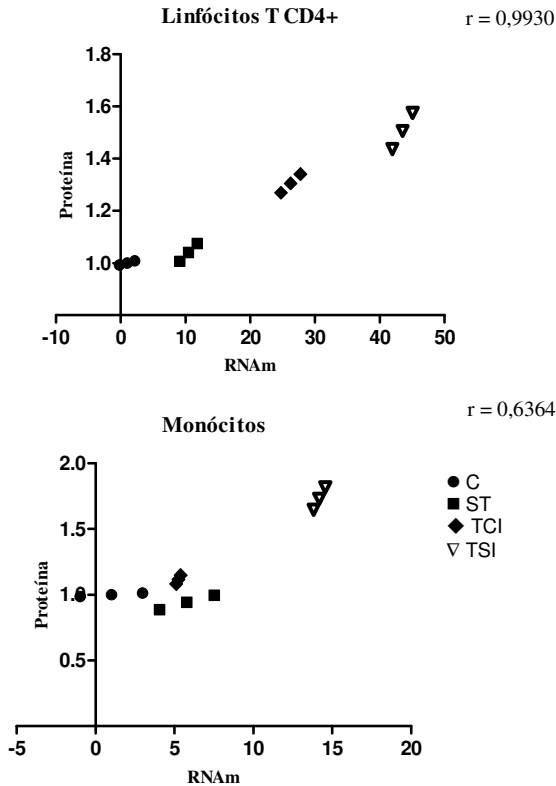


Figura 6. Correlação entre os níveis de RNAm de GRP78/BiP e proteína GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺ e monócitos. No eixo x estão representados os valores referentes à transcrição de GRP78/BiP, os quais representam a *fold change* médio em relação ao grupo controle. No eixo y estão representados os resultados de tradução de GRP78/BiP, os quais representam valores de intensidade médio das bandas visualizadas no Western Blot com relação ao grupo controle. A normalização dos valores de RNAm foi realizada utilizando-se os genes de referência GAPDH e $\beta 2M$, ao passo que a normalização dos valores de proteína foi realizada utilizando-se a proteína actina. Em cada um dos grupos estão apresentados a média mais o erro padrão, a média e a média menos o erro padrão. C: indivíduos HIV negativos; ST: indivíduos HIV positivos sem tratamento antirretroviral; TCI: indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor da protease; TSI: indivíduos positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor da protease.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a transcrição da chaperona GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺ e monócitos provenientes de indivíduos HIV positivos sob diferentes esquemas terapêuticos em comparação aos indivíduos HIV negativos através da metodologia de RT-qPCR. Os diferentes esquemas terapêuticos incluídos neste estudo foram a ausência de tratamento, tratamento antirretroviral com inibidor da protease e tratamento antirretroviral sem inibidor da protease.

A avaliação da pureza das amostras contendo linfócitos T CD4⁺ e monócitos (BORSA, 2012) demonstrou que a metodologia empregada para a separação destas subpopulações celulares a partir das amostras de sangue total dos indivíduos avaliados foi adequada para esta proposta. Por outro lado, a metodologia empregada para extração do RNA total mostrou-se ineficiente para este fim, uma vez que foram obtidas concentrações totais de RNA muito variáveis, além de muito baixas em algumas amostras. Um fator que pode ter contribuído para o baixo rendimento do processo de extração do RNA foi o pequeno volume de lisado celular utilizado, sendo este de apenas 100 µl. A metodologia de RT-qPCR, por sua vez, mostrou-se adequada para a avaliação da transcrição de GRP78/BiP. A escolha desta técnica foi baseada na sua especificidade e sensibilidade (HUGGETT *et al.*, 2005), fornecendo assim uma acurada quantificação dos níveis de RNAm. Dessa forma, embora tenham sido obtidas baixas concentrações de RNA total em algumas amostras, a metodologia de RT-qPCR pode ser considerada sensível o suficiente para amplificar pequenas quantidades de material inicial.

A quantificação dos níveis de RNAm de GRP78/BiP em relação aos genes de referência β 2M e GAPDH demonstrou um aumento significativo na transcrição de GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺ provenientes de indivíduos HIV positivos em comparação aos indivíduos HIV negativos. Esse aumento transcricional de GRP78/BiP pode ser um indicativo de estresse no RE e consequente ativação da via UPR em linfócitos T CD4⁺ em decorrência da infecção pelo HIV. Isso porque as infecções virais têm sido apontadas como uma das causas de desequilíbrio das funções normais do RE. Para assegurar que a infecção seja eficiente, os vírus demandam a síntese de uma grande quantidade de proteínas. Essa síntese ocorre no RE, organela que é também responsável pelo dobramento e algumas modificações pós-traducionais destas proteínas. Dessa forma, durante a infecção viral há uma sobrecarga das funções do RE, o que pode resultar em um acúmulo de

proteínas mal dobradas no seu interior (HE, 2006; KIM; XU; REED, 2008).

O acúmulo de proteínas mal dobradas no lúmen do RE é detectado através da dissociação de GRP78/BiP das proteínas transmembrana do RE: IRE1, PERK e ATF6. Em condições normais, a chaperona GRP78/BiP interage com estas proteínas, mantendo-as em um estado inativo. Entretanto, em condições de estresse no RE e consequente acúmulo de proteínas mal dobradas, GRP78/BiP dissocia-se, interagindo preferencialmente com proteínas mal dobradas. Uma vez desfeita a interação, IRE1, PERK e ATF6 estarão livres para serem ativados, ativando vias de sinalização denominadas coletivamente como UPR (WALTER; RON, 2011).

A ativação da via UPR busca restabelecer a homeostasia do RE através de controles transcricionais e traducionais. Para tanto, sua ativação leva à produção de fatores de transcrição, os quais atuarão em promotores de genes específicos conduzindo a um aumento da expressão de chaperonas (WALTER; RON, 2011), aumento da síntese de lipídios (SCHRÖDER; KAUFMAN, 2006) e a um aumento da degradação de proteínas mal dobradas (SMITH; PLOEGH; WEISSMAN, 2011). Além disso, há a inibição da síntese proteica, havendo tradução seletiva dos RNAm codificantes para genes alvo da via UPR. Embora os três elementos regulatórios da via UPR, IRE1, PERK e ATF6 desencadeiem diferentes vias de sinalização, suas ações convergem para o aumento da transcrição de GRP78/BiP. Por esse motivo, o aumento da transcrição desta chaperona tem sido considerado um indicativo de estresse no RE e consequente ativação da via UPR (LEE, 2005).

Nas condições descritas acima, GRP78/BiP desempenha importante papel no restabelecimento da homeostasia do RE por auxiliar o correto dobramento de proteínas e direcionar proteínas que falham em atingir sua conformação madura à degradação em proteassomos (HENDERSHOT, 2004). Caso a ativação da via UPR não seja suficiente para o restabelecimento das funções normais do RE, mecanismos apoptóticos podem ser ativados (COSTA; DA ROSA; DE CAMARGO, 2011). No contexto das infecções virais, a morte celular resultante da ativação da via UPR tem sido considerada como sendo um mecanismo evolutivo para evitar a disseminação do vírus para as células vizinhas contendo, dessa forma, a infecção (XU; BAILLY-MAITRE; REED, 2005).

Pelo fato da replicação viral depender do correto funcionamento do RE, a via UPR desempenha um importante papel para a manutenção

da infecção viral. Porém, alguns mecanismos regulatórios resultantes desta ativação são desfavoráveis à replicação viral. Estes incluem a inibição da síntese de proteínas e a degradação de proteínas mal dobradas. Embora proteínas mal dobradas não sejam funcionais, o aumento da expressão de chaperonas poderia favorecer o correto dobramento das proteínas virais, não sendo necessária a sua degradação. Dessa forma, a via UPR pode ser modulada pelos vírus a fim de não só garantir a replicação viral, mas também torná-la mais eficiente. De fato, diversos estudos têm demonstrado que os vírus possuem diferentes mecanismos para regular de maneira seletiva a atuação de alguns componentes da via UPR. Alguns exemplos incluem os vírus HCV, CMV, DENV e HBV.

No contexto do HIV, a indução da expressão de GRP78/BiP seria benéfica à replicação viral considerando as propriedades atribuídas à esta chaperona. Primeiramente GRP78/BiP facilitaria o dobramento e montagem das proteínas virais. Segundo, ela detectaria proteínas virais mal dobradas e poderia fazer com que estas proteínas atinjam a sua correta conformação, evitando que proteínas não funcionais componham o vírus (HENDERSHOT, 2004). Terceiro, ela impediria a ativação de mecanismos apoptóticos, o que evitaria a disseminação do vírus para as células vizinhas (XU; BAILLY-MAITRE; REED, 2005). Dessa forma, o aumento na transcrição de GRP78/BiP em indivíduos HIV positivos pode ser explicado pelo fato de GRP78/BiP desempenhar um importante papel na replicação deste vírus.

GRP78/BiP é capaz de ligar-se a proteínas durante a sua translocação para o interior do RE. Dessa forma, ela impede a formação de agregados e mantém as proteínas recém-sintetizadas em uma conformação que facilite o seu correto dobramento. A proteína do HIV gp160 é sintetizada e translocada para o lúmen do RE onde ocorrem os eventos de glicosilação, formação de pontes dissulfeto e aquisição de estrutura tridimensional que a torne competente para interagir com o receptor de superfície celular CD4. Do momento de translocação para o interior do RE até a completa aquisição da estrutura madura, gp160 interage de maneira não-covalente com GRP78/BiP. Essa interação embora não seja considerada sequência-específica, ocorre em sítios localizados em regiões conservadas de gp160. Regiões estas que somente estão disponíveis no momento anterior ao dobramento protéico. Dessa forma, tem-se sugerido que a interação de GRP78/BiP com gp160 desempenhe importante papel na prevenção de agregação, além de auxiliar o correto dobramento desta proteína viral (EARL; MOSS;

DOMS, 1991; KNARR *et al.*, 1999; LAND; ZONNEVELD; BRAAKMAN, 2003).

Uma vez que a proteína gp160 tenha atingido sua conformação madura, esta é exportada para o aparelho de Golgi onde é clivada nas proteínas gp120 e gp41. Gp120 é responsável pela adsorção do vírus ao receptor CD4 presente na superfície da célula hospedeira, enquanto gp41 medeia a fusão do envelope viral com a membrana plasmática da célula hospedeira (DALGLEISH *et al.*, 1984). A adsorção do vírus ao receptor celular CD4 somente é possível diante de um correto dobramento da proteína gp160, demonstrando a importância de GRP78/BiP para o evento inicial de infecção pelo HIV (EARL; MOSS; DOMS, 1991). Adicionalmente, foi observado que o dobramento de gp160 no lúmen do RE ocorre de maneira extremamente lenta quando comparado ao tempo requerido por outras proteínas cujo dobramento também ocorre no RE (LAND; ZONNEVELD; BRAAKMAN, 2003). Dessa forma, gp160 reside por um longo período de tempo no lúmen do RE, requerendo uma associação prolongada com GRP78/BiP, o que sustentaria a necessidade de uma produção aumentada de GRP78/BiP. De fato, a meia-vida de interação entre gp160 e GRP78/BiP foi estimada ser de 30 minutos (OTTEKEN; EARL; MOSS, 1996).

Somado ao fato da demora para aquisição da conformação tridimensional precisa, que requer uma associação prolongada com a chaperona GRP78/BiP, foi também observada uma interação permanente entre GRP78/BiP e gp160 (EARL; MOSS; DOMS, 1991). Isso demonstra que algumas proteínas falham em adquirir a sua conformação madura, fato que retém as chaperonas por um período de tempo maior. Dessa forma, em situações de elevada síntese de proteínas, como ocorre durante a infecção viral, é requerido uma grande quantidade de chaperonas para auxiliar as proteínas recém-sintetizadas a atingirem a sua conformação correta. Porém, se as chaperonas estão confinadas a interações com proteínas mal dobradas, faz-se necessária uma síntese aumentada destas chaperonas. Caso contrário, as proteínas mal dobradas serão direcionadas à degradação, reduzindo a produção de partículas virais.

Outra vantagem do aumento da transcrição de GRP78/BiP para a replicação do HIV refere-se à sua propriedade anti-apoptótica. Ao impedir a morte da célula hospedeira, GRP78/BiP ajuda a manter a replicação viral e favorece a disseminação das partículas virais para infectarem as células vizinhas. Foi demonstrado que GRP78/BiP é capaz de ligar-se a procaspase 7, impedindo a sua clivagem e consequente ativação, bloqueando, portanto, a ativação dos mecanismos apoptóticos

desencadeados pela ativação desta proteína (REDDY *et al.*, 2003). Adicionalmente, foi verificado que o aumento da expressão de GRP78/BiP é capaz de suprimir a apoptose induzida por BIK (*BCL-2-interacting killer*) em células mamárias humanas cancerosas (ZHOU *et al.*, 2011). BIK é uma proteína presente na membrana do RE e atua regulando a liberação de cálcio do RE, interagindo com proteínas que promovem a rápida liberação de citocromo *c* da mitocôndria e ativando caspases (MATHAI; GERMAIN; SHORE, 2005). Dessa forma, a atuação de BIK conduz a célula a apoptose. A interação de GRP78/BiP com BIK, porém, impede que este exerça suas funções, resultando na inibição da apoptose (ZHOU *et al.*, 2011). De fato, *knockdown* de GRP78/BiP resultou em apoptose em células pancreáticas durante o processo patológico de pancreatite (LIU *et al.*, 2014a). Em células tumorais, *knockdown* de GRP78/BiP resultou em aumento da sensibilidade destas células ao tratamento (LI; LEE, 2006). Por esses motivos, a expressão de GRP78/BiP é mantida a níveis basais na maioria dos órgãos adultos, sendo fortemente induzida em células tumorais a fim de manter a sobrevivência tumoral (LI; LEE; LEE, 2006).

Os mecanismos apoptóticos desencadeados pela ativação da via UPR são decorrentes da produção do fator de transcrição CHOP. Este fator atua reduzindo drasticamente os níveis celulares do fator anti-apoptótico BCL-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) (LIU *et al.*, 2014b). BCL-2 atua suprimindo a liberação de cálcio do RE e consequentemente suprimindo a ativação de mecanismos apoptóticos. Além disso, BCL-2 interage com o fator apoptótico BIK, regulando-o. A diminuição dos níveis celulares de BCL-2 resultantes da produção do fator de transcrição CHOP, faz com que BIK esteja livre para atuar potencializando a liberação de citocromo *c* da mitocôndria, iniciando o mecanismo intrínseco de morte celular.

A infecção pelo HIV requer a síntese de uma grande quantidade de proteínas virais. Dessa forma, a infecção pelo HIV pode resultar em estresse no RE e consequente ativação da via UPR. Nesse contexto, a via UPR pode ser mantida ativa por um tempo prolongado, podendo desencadear mecanismos apoptóticos. Entretanto, a manutenção da replicação do HIV depende da sobrevivência da célula hospedeira. Dessa forma, um aumento transcricional de GRP78/BiP em células infectadas pelo HIV, resultaria em uma maior interação desta chaperona com BIK, impedindo que este ative mecanismos apoptóticos. Diante do exposto, um aumento transcricional de GRP78/BiP em células

infectadas é também justificado como uma maneira de favorecer a disseminação viral ao impedir a apoptose da célula hospedeira.

Outro fator que tem sido apontado como causa de estresse no RE e consequente ativação da via UPR é a administração de fármacos antirretrovirais. No presente estudo, a transcrição de GRP78/BiP foi avaliada com relação à presença ou ausência do tratamento antirretroviral, bem como o tratamento antirretroviral contendo ou não inibidor da protease. Como resultado, foi observado um aumento significativo da transcrição de GRP78/BiP nos linfócitos T CD4⁺ oriundos de indivíduos HIV positivos sem tratamento antirretroviral quando comparados ao grupo controle (10,5 vezes). Aumento maior foi verificado nos indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor da protease em comparação aos níveis de RNAm de GRP78/BiP nos indivíduos HIV negativos (26,2 vezes). Por fim, os indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor da protease demonstraram o maior aumento da transcrição de GRP78/BiP em comparação aos indivíduos HIV negativos (43,5 vezes). Porém, embora este aumento tenha sido significativo com relação ao grupo controle, a comparação múltipla entre os grupos revelou que as diferenças observadas entre eles não foram consideradas estatisticamente significativas. Isso sugere, portanto, que o aumento da transcrição de GRP78/BiP observado em linfócitos T CD4⁺ não foi relacionado a presença de tratamento antirretroviral nem ao esquema terapêutico utilizado.

A análise das diferenças observadas nos níveis de RNAm de GRP78/BiP entre o grupo contendo indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral com inibidor da protease e o grupo contendo indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor da protease revelou que tais diferenças não são estatisticamente significativas ($p > 0.05$). Isso indica que a presença de inibidor da protease não interferiu na transcrição de GRP78/BiP. No Brasil, o tratamento antirretroviral inicial compreende o uso combinado de três fármacos: dois inibidores da transcriptase reversa análogos de nucleosídeos e nucleotídeos (ITRN/ITRNt) somada à presença ou de um inibidor da transcriptase reversa não análogo de nucleosídeo (ITRNN) ou de um inibidor da protease reforçado com ritonavir (IP/r) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

O emprego de inibidores de protease tem sido associado a distúrbios no metabolismo de lipídios, sendo os efeitos adversos mais comuns a lipodistrofia, a hiperlipidemia e a resistência à insulina (HUI, 2003). A administração de doses terapêuticas dos inibidores da protease

atazanavir e ritonavir em macrófagos e hepatócitos murinos resultou em ativação da via UPR e indução de apoptose celular (ZHOU *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2006). A ativação da via UPR em macrófagos foi resultante de um acúmulo de colesterol livre intracelular e redução nos estoques de cálcio do RE (ZHOU *et al.*, 2005). A administração de doses clínicas dos inibidores da protease indinavir, ritonavir, nelfinavir ou amprenavir em células beta do pâncreas de camundongo resultou em inibição da liberação de insulina estimulada por glicose (KOSTER *et al.*, 2003). Adicionalmente, a administração de doses terapêuticas de ritonavir resultou na indução de estresse no RE e ativação da via UPR em células derivadas de sarcoma humano (KRAUS *et al.*, 2008).

Diante do exposto, é possível verificar que diversos estudos apontam a ativação da via UPR em decorrência da administração de inibidores da protease. Porém, cabe ressaltar que a maioria dos estudos não foi realizada em células humanas, não havendo, portanto, estudos de administração da droga antirretroviral em conjunto com a infecção pelo HIV. No presente estudo não foram coletados dados dos pacientes com relação aos fármacos antirretrovirais utilizados, não sendo possível, portanto, fazer uma correlação com esses estudos anteriores. Adicionalmente, não há estudos mostrando o efeito da administração de inibidores da protease em linfócitos T CD4⁺.

Outro esquema terapêutico utilizado por indivíduos HIV positivos faz uso dos ITRNN ao invés dos inibidores da protease. Os estudos realizados com estes medicamentos também indicam a ativação da via UPR, porém o estresse resultante do emprego destes fármacos mostrou-se diferente daquele visualizado quando são administrados inibidores da protease. Isso porque foi demonstrado que a administração dos ITRNN, além de resultar em distúrbios no metabolismo de lipídios, é também tóxica para a mitocôndria. Estudo realizado com o fármaco efavirenz, um dos ITRNN mais utilizados no tratamento antirretroviral, demonstrou que sua administração resultou em disfunção mitocondrial seguida por disfunção do RE em hepatócitos humanos (APOSTOLOVA *et al.*, 2013). Estudo anterior, também realizado em hepatócitos humanos, indicou que a administração de efavirenz afeta diretamente a função da mitocôndria por induzir uma diminuição do potencial de membrana, aumentar a massa mitocondrial, bem como aumentar a produção de superóxido seguido por redução no conteúdo celular de glutatona (APOSTOLOVA *et al.*, 2010). Dessa forma, há um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e diminuição da proteção celular contra tais compostos, implicando em estresse oxidativo. Outro estudo sugere que as alterações na mitocôndria em decorrência da

administração de efavirenz são atribuídas à inibição específica do complexo I da cadeia respiratória. Tal interferência resulta em acúmulo de lipídios no citoplasma e pode estar associado ao fato de que, posterior à disfunção da mitocôndria, ocorra também disfunção do RE (BLAS-GARCIA *et al.*, 2010). A administração de efavirenz resultou em um aumento na expressão de GRP78/BiP, o qual foi dependente da concentração de efavirenz administrado. Esse aumento na expressão da chaperona GRP78/BiP foi reduzido em hepatócitos cujas mitocôndrias foram removidas. A administração dos inibidores da protease ritonavir e lopinavir não resultou em toxicidade na mitocôndria (APOSTOLOVA *et al.*, 2013), reforçando o fato de que apenas os ITRNN são tóxicos à mitocôndria.

Diante do exposto, é possível verificar que a utilização de tratamento antirretroviral induz o estresse no RE e como consequência implica na ativação da via UPR. Entretanto, a comparação dos níveis de RNAm de GRP78/BiP entre o grupo sem tratamento antirretroviral e o grupo com tratamento antirretroviral sem inibidor da protease demonstrou que as diferenças observadas não foram consideradas estatisticamente significativas. Adicionalmente, a comparação entre o grupo sem tratamento antirretroviral e o grupo com tratamento antirretroviral com inibidor da protease demonstrou o mesmo resultado. Portanto, os dados obtidos no presente estudo indicaram que a presença de tratamento, independente do esquema terapêutico utilizado, não resultou em aumento da transcrição da chaperona GRP78/BiP.

Primeiramente, cabe destacar que a escolha do esquema terapêutico bem como dos fármacos que irão compô-lo é dependente da condição de saúde do paciente, da sua adesão ao tratamento, bem como da sua resposta frente ao tratamento. Dessa forma, o tratamento utilizado é muito heterogêneo, podendo cada indivíduo analisado no presente estudo fazer uso de diferentes fármacos antirretrovirais. Adicionalmente, o tratamento antirretroviral tem por objetivo a inibição da replicação viral, mantendo a carga viral baixa ou mesmo indetectável. Dessa forma, indivíduos que fazem uso de tratamento antirretroviral devem apresentar baixas taxas de replicação viral e, portanto, o estresse no RE pode não ser comparável ao de indivíduos HIV positivos que não fazem uso da mesma terapia. Entretanto, no presente estudo não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos contendo indivíduos tratados e não-tratados. Isso pode ser explicado pelo fato de que os indivíduos não-tratados avaliados neste estudo também poderiam apresentar baixas taxas de replicação viral, uma vez que eles não faziam uso do tratamento antirretroviral por apresentarem contagem de

linfócitos T CD4⁺ superior a 500 células/mm³ (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Dessa forma, é possível concluir que a infecção pelo HIV resultou em um aumento da transcrição de GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺. Esse aumento não foi relacionado ao tratamento antirretroviral, pelo fato de que indivíduos não tratados também o apresentaram. Uma possível explicação é o fato dos indivíduos de ambos os grupos, tratados e não tratados, poderem apresentar produções virais similares e, portanto, o estresse no RE e consequente ativação da via UPR sejam comparáveis. Adicionalmente, não há estudos dos efeitos da administração de fármacos antirretrovirais em linfócitos T CD4⁺, de modo que não é possível atribuir a estes fármacos a indução de estresse no RE destas células.

A análise da transcrição de GRP78/BiP em monócitos provenientes de indivíduos HIV positivos não demonstrou diferença estatisticamente significativa quando comparado aos indivíduos HIV negativos. Adicionalmente, não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas quando os grupos compostos por indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral foram comparados ao grupo contendo indivíduos HIV positivos sem tratamento antirretroviral. Da mesma forma, não foram visualizadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos contendo indivíduos sob diferentes esquemas terapêuticos. Um fator que pode ter contribuído para esse resultado foi o baixo tamanho amostral para essa subpopulação celular. Em comparação aos linfócitos T CD4⁺, os monócitos apresentaram uma quantidade maior de *outliers* e, dessa forma, uma maior quantidade de indivíduos foram excluídos das análises.

Por fim, a análise de correlação entre a transcrição e a tradução de GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺ e monócitos demonstrou uma correlação positiva e estatisticamente significativa. Dessa forma, os aumentos nos níveis de RNAm codificante para GRP78/BiP verificados em linfócitos T CD4⁺ também resultaram em aumentos na produção da proteína GRP78/BiP. Em monócitos, a correlação não foi tão evidente quanto nos linfócitos T CD4⁺, sendo verificada principalmente nos indivíduos HIV positivos sob tratamento antirretroviral sem inibidor da protease. A importância dessa análise de correlação reside no fato de que um aumento de transcrição não necessariamente implica em aumento da tradução. O oposto é da mesma maneira verdadeiro, pois muitos RNAm têm a eficiência de tradução aumentada, de modo que aumentos na produção de proteína não são acompanhados de aumentos

na transcrição. Adicionalmente, embora a produção da chaperona GRP78/BiP seja necessária para o restabelecimento da homeostasia do RE em condições de estresse, a ativação da via UPR resulta em um aumento transcricional de GRP78/BiP. Dessa forma, para se avaliar a ativação da via UPR através de GRP78/BiP, é necessário avaliar o aumento transcricional desta chaperona. De fato, os estudos envolvendo a ativação da via UPR cuja avaliação se dá através da expressão das suas proteínas constituintes ou proteínas cuja expressão é aumentada em decorrência desta ativação, são feitos tanto a nível transcricional quanto traducional. Da análise de correlação é possível concluir que o aumento dos níveis de RNAm codificantes para GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺ foi acompanhado por um aumento da tradução destes RNAm. Os monócitos, embora, também tenham apresentado essa correlação positiva, esta foi considerada mais fraca do que aquela verificada nos linfócitos T CD4⁺.

A avaliação de outras moléculas cuja expressão é influenciada pela ativação da via UPR é necessária para um maior entendimento acerca da via UPR em células infectadas pelo HIV. Porém, a presença de um aumento nos níveis de RNAm e proteína GRP78/BiP são um indicativo de que a infecção pelo HIV resulta em estresse no RE e conseqüentemente leva à ativação da via UPR. Uma maior produção da chaperona GRP78/BiP é vantajosa para o HIV, uma vez que o correto dobramento da proteína gp160 e conseqüentemente sua função são dependentes da atuação desta chaperona. Considerando a função de adsorção viral desempenhada por uma das proteínas originadas a partir da clivagem de gp160, a sua funcionalidade é imprescindível para que ocorra a infecção. GRP78/BiP também detecta proteínas virais mal dobradas e auxilia o seu correto dobramento, garantindo a sua funcionalidade. Caso a correta conformação não seja atingida, GRP78/BiP induz a degradação dessas proteínas mal dobradas nos proteassomos, impedindo que sejam formadas partículas virais contendo proteínas não funcionais. Adicionalmente, GRP78/BiP atua inibindo a apoptose, impedindo que a morte da célula hospedeira impeça a replicação viral.

Dessa forma, GRP78/BiP pode ser considerada um potente alvo terapêutico para o combate à infecção pelo HIV. Embora a terapia antirretroviral disponível no momento seja composta por um amplo espectro de fármacos e tenha prolongado e melhorado a vida dos indivíduos HIV positivos, seu uso tem sido associado a diversos efeitos adversos. Dessa forma, faz-se necessária a busca por alvos terapêuticos alternativos ao tratamento disponível atualmente.

6. SUMÁRIO DE RESULTADOS

1. A metodologia de RT-qPCR mostrou-se adequada para avaliar os níveis de RNAm codificante para GRP78/BiP em comparação aos níveis de RNAm codificantes para os genes de referência GAPDH e β 2M em linfócitos T CD4⁺ e monócitos.

2. Os iniciadores utilizados neste estudo mostraram-se específicos para a sequência alvo, além de apresentarem boas eficiências de amplificação.

3. A quantificação dos níveis de RNAm codificante para GRP78/BiP em relação aos genes de referência β 2M e GAPDH demonstrou um aumento significativo na transcrição de GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺ provenientes de indivíduos HIV positivos em comparação aos indivíduos HIV negativos.

4. A análise das diferenças observadas nos níveis de RNAm codificante para GRP78/BiP em linfócitos T CD4⁺ nos diferentes grupos compostos por indivíduos HIV positivos (ST, TCI, TSI) demonstrou que estas diferenças não são estatisticamente significativas.

5. Não foi observado aumento significativo na transcrição de GRP78/BiP em monócitos provenientes de indivíduos HIV positivos quando comparados ao grupo controle.

6. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de RNAm codificantes para GRP78/BiP em monócitos quando os grupos compostos por indivíduos HIV positivos (ST, TCI e TSI) foram comparados entre si.

7. A análise de correlação entre os níveis de RNAm codificante para GRP78/BiP e níveis proteicos de GRP78/BiP demonstrou que o aumento transcricional foi acompanhado por um aumento traducional desta chaperona.

8. A correlação transcricional e traducional de GRP78/BiP mostrou-se mais forte em linfócitos T CD4⁺ do que em monócitos, embora em ambos ela tenha sido considerada estatisticamente significativa.

7. PERSPECTIVAS

Para um maior entendimento acerca do efeito da infecção pelo HIV na ativação da via UPR, faz-se necessária a avaliação da transcrição de genes codificantes para outros componentes da via UPR. Uma boa opção é a avaliação da transcrição do fator de transcrição XBP1, uma vez que sua produção é induzida em decorrência da ativação das vias de sinalização desencadeadas por IRE1 e ATF6. Adicionalmente, poderia ser avaliada a transcrição dos demais fatores de transcrição: ATF4 e ATF6. Dessa forma, seria possível ter um panorama geral da ativação da via UPR.

A fim de avaliar a transcrição de GRP78/BiP em células que contenham a influência do fármaco antirretroviral, mas não do HIV, serão realizados ensaios de qPCR com as amostras de linfócitos B. Dessa forma, será possível verificar se o aumento transcricional de GRP78/BiP verificado em indivíduos tratados quando comparados ao grupo controle, foi devido apenas à infecção pelo HIV ou à presença do tratamento antirretroviral.

REFERÊNCIAS

APOSTOLOVA, N. *et al.* Enhanced oxidative stress and increased mitochondrial mass during Efavirenz-induced apoptosis in human hepatic cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, p. 2069-2084, 2010.

APOSTOLOVA, N. *et al.* ER stress in human hepatic cells treated with Efavirenz: Mitochondria again. **Journal of Hepatology**, v. 59, p.780-789, 2013.

APPLIED BIOSYSTEMS. Real-time PCR: Understanding Ct. **Application Note**. 2011. Disponível em: <<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/PCR/real-time-pcr/qpcr-education/pcr-understanding-ct-application-note.html>>. Acesso em 20 de julho de 2013.

BLAS-GARCIA, A. *et al.* Inhibition of mitochondrial function by Efavirenz increases lipid content in hepatic cells. **Hepatology**, v. 52, p. 115-125, 2010.

BORSA, M. **Avaliação da ativação da via UPR (unfolded protein response) em células de indivíduos HIV positivos sob diferentes esquemas terapêuticos**. 2012. 60f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

BRAND, S. R.; KOBAYASHI R.; MATHEWS, M. B. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 is a substrate and inhibitor of the interferon-induced, virally activated protein kinase, PKR. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 8388-8395, 1997.

BUCHKOVICH, N. J. *et al.* Human cytomegalovirus specifically controls the levels of the endoplasmic reticulum chaperone BiP/GRP78, which is required for virion assembly. **Journal of Virology**, v. 84, p. 11479-11486, 2008.

BUCHKOVICH, N. J. *et al.* Human cytomegalovirus induces the endoplasmic reticulum chaperone BiP through increased transcription and activation of translation by using the BiP internal ribosome entry site. **Journal of Virology**, v. 84, p. 11479-86, 2010.

CAI, R. *et al.* HIV-1 Tat inhibits PKR activity by both RNA-dependent and RNA-independent mechanisms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, p. 361-367, 2000.

CARR, A. *et al.* A syndrome of peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia and insulin resistance in patients receiving HIV protease inhibitors. **AIDS**, v. 12, p. F51-58, 1998.

CASELLI, E. *et al.* Activating transcription factor 4 (ATF4) promotes HIV type 1 activation. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 27, p. 1-6, 2012.

CHAN, S. W.; EGAN, P. A. Effects of hepatitis C virus envelope glycoprotein unfolded protein response activation on translation and transcription. **Archives of Virology**, v. 154, p. 1631-1640, 2009.

CHO, D. *et al.* Molecular chaperone GRP78/BiP interacts with the large surface protein of Hepatitis B virus *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Virology**, v. 77, p. 2784-2788, 2003.

CLEMENS, M. J. *et al.* Regulation of the interferon-inducible eIF-2 alpha protein kinase by small RNAs. **Biochimie**, v. 76, p. 770-778, 1994.

COSTA, C. Z. F.; DA ROSA, S. E. A; DE CAMARGO, M. M. The unfolded protein response: how protein folding became a restrictive aspect for innate immunity and B lymphocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, p. 436-448, 2011.

DALGLEISH *et al.* The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. **Nature**, v. 312, p.763-767, 1984.

D'ALESSIO, C.; CAMELO, J. J.; PARODI, A. J. UDP-GIC: Glycoprotein glucosyltransferase-glucosidase II, the ying-yang of the ER quality control. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 21, p.491-499, 2010.

DOBSON, C. M.; SALI, A.; KARPLUS, M. Protein folding - a perspective from theory and experiment. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 37, p. 868-893, 1998.

EARL, P. L.; MOSS, B.; DOMS, R. W. Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. **Journal of Virology**, v. 65, p. 2047-2055, 1991.

ELLGAARD, L.; HELENIUS, A. Quality control in the endoplasmic reticulum. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v 4, p. 181–191, 2003.

ENDO-MUNOZ, L. *et al.* Phosphorylation of HIV Tat by PKR increases interaction with TAR RNA and enhances transcription. **Virology Journal**, v. 2, p. 1-13, 2005.

FLYNN, G. C. *et al.* Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. **Nature**, v. 353, p. 726-730, 1991.

GANSER-PORNILLOS, B. K.; YEAGER, M.; SUNDQUIST, W. I. The structural biology of HIV assembly. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, p. 203-217, 2008.

GETHING, M. J.; SAMBROOK, J. Protein folding in the cell. **Nature**, v. 355, p. 33-45, 1992.

GONZALEZ, A. *et al.* Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage. **BMC Molecular Biology**, v. 9, p. 1-7, 2008.

HAAS, I. G. BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. **Experientia**, v. 50, p. 1012-1020, 1994.

HARTL, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 381, p. 571-580, 1996.

HARTL, F. U.; BRACHER, A; HARTL-HAYER, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. **Nature**, v. 475, p. 324-332, 2011.

HAZE, K. *et al.* Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. **Molecular Biology of the Cell**, v. 10, p. 3787-3799, 1999.

HE, R. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, p. 393-403, 2006.

HENDERSHOT, L. M. The ER function BiP is a master regulator of ER function. **Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 71, p. 289-297, 2004.

HEGDE, N. R. *et al.* The role of BiP in endoplasmic reticulum-associated degradation of major histocompatibility complex class I heavy chain induced by cytomegalovirus proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 20910-20919, 2006.

HIRAMATSU, N.; JOSEPH, V. T.; LIN, J. H. Monitoring and manipulating mammalian unfolded protein response. **Methods in Enzymology**, v. 491, p. 183-198, 2011.

HOLCIK, M.; SONENBERG, N. Translational control in stress and apoptosis. **Nature**, v. 6, p. 318-327, 2005.

HUGGETT, J. *et al.* Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, v. 6, p.279-284, 2005.

HUI, D. Y. Effects of HIV protease inhibitor therapy on lipid metabolism. **Progress in Lipid Research**, v. 42, p. 81-92, 2003.

ISLER, J. A.; SKALET, A. H.; ALWINE, J. C. Human cytomegalovirus infection activates and regulates the unfolded protein response. **Journal of Virology**, v. 79, p. 6890-6899, 2005.

JHENG, J. R. *et al.* Endoplasmic reticulum stress is induced and modulated by enterovirus 71. **Cellular Microbiology**, v. 12, p. 796-813, 2010.

JOHNSON, D. C.; HEGDE, N. R. Inhibition of the MHC class II antigen presentation pathway by human cytomegalovirus. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 269, p. 101-115, 2002.

KAUFMAN, R. J. *et al.* The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, p. 411–421, 2002.

KEPP, O. *et al.* Viral subversion of immunogenic cell death. **Cell Cycle**, v. 8, p. 860-869, 2009.

KIM, Y. K.; KIM, K. S.; LEE, A. S. Regulation of the glucose-regulated protein genes by β -mercaptoethanol requires de novo protein synthesis and correlates with inhibition of protein glycosylation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 133, p. 553-559, 1987.

KIM, I.; XU, W.; REED, J. C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nature**, v. 7, p. 1013-1030, 2008.

KNARR, G. *et al.* BiP-binding sequences in HIV gp160. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 29850-29857, 1999.

KOSTER, J. C. *et al.* HIV protease inhibitors acutely impair glucose-stimulated insulin release. **Diabetes**, v. 52, p. 1695-1700, 2003.

KOZERA B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**, v. 54, p. 391-406, 2013.

KRAUS, M. *et al.* Ritonavir induces endoplasmic reticulum stress and sensitizes sarcoma cells toward bortezomib-induced apoptosis. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, p. 1940-1948, 2008.

LAND, A; BRAAKMAN, I. Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum. **Biochimie**, v. 83, p. 783-790, 2001.

LAND, A.; ZONNEVELD, D.; BRAAKMAN, I. Folding of HIV-1 envelope glycoprotein involves extensive isomerization of disulfide bonds and conformation-dependent leader peptide cleavage. **The FASEB Journal**, v. 17, p. 1058-1067, 2003.

LARIONOV, A.; KRAUSE, A.; MILLER, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. **BMC Bioinformatics**, v. 6, p. 1-16, 2005.

LEE, A. S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. **Methods**, v. 35, p. 373-381, 2005.

LEE, A. S. GRP78 Induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. **Cancer Research**, v. 67, p. 3496-3499, 2007.

LI, W. W. *et al.* Stress induction of the mammalian GRP78/BiP protein gene: *in vivo* genomic footprinting and identification of p70CORE from human nuclear extract as a DNA-binding component specific to the stress regulatory element. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, p. 5533-5546, 1994.

LI, J.; LEE, A. S. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. **Current Molecular Medicine**, v. 6, p-45-54, 2006.

LI, J.; LEE, B.; LEE, A. S. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 7260-7270, 2006.

LI, S. *et al.* Hepatitis C virus NS4B induces unfolded protein response and endoplasmic reticulum overload response-dependent NF- κ B activation. **Virology**, v. 391, p. 257-264, 2009.

LIMJINDAPORN, T. *et al.* Interaction of dengue virus envelope protein with endoplasmic reticulum-resident chaperones facilitates dengue virus production. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 379, p. 196-200, 2009.

LIU, Y. *et al.* Knockdown of GRP78 promotes apoptosis in pancreatic acinar cells and attenuates the severity of cerulein and LPS induced pancreatic inflammation. **Plos One**, v. 9, 2014a.

LIU, K. *et al.* CHOP mediates ASPP2-induced autophagic apoptosis in hepatoma cells by releasing Beclin-1 from Bcl-2 and inducing nuclear translocation of Bcl-2. **Cell Death and Disease**, v. 5, p.1-11, 2014b.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

MA, Y.; HENDERSHOT, L. M. ER chaperone functions during normal and stress conditions. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 28, p. 51-65, 2004.

MACHAMER, C. E. *et al.* Heavy chain binding protein recognizes incompletely disulfide-bonded forms of vesicular stomatitis virus G protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 6879-6883, 1990.

MATHAI, J. P.; GERMAIN, M.; SHORE, G. C. BH3-only BIK regulates BAX,BAK-dependent release of Ca²⁺ from endoplasmic reticulum stores and mitochondrial apoptosis during stress-induced cell death. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 23829-23836, 2005.

MATSUMOTO, A.; HANAWALT, P. C. Histone H3 and heat shock protein GRP78 are selectively cross-linked to DNA by photoactivated gilyvocarcin V in human fibroblasts. **Cancer Research**, v. 60, p. 3921-3926, 2000.

MCMILLAN, N. A. *et al.* HIV Tat directly interacts with the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent kinase, PKR. **Virology**, v. 213, p. 413-424, 1995.

MILLER, R. H.; SARVER, N. HIV accessory proteins as therapeutic targets. **Nature Medicine**, v. 3, p. 389-394, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para adultos vivendo com HIV/AIDS (versão preliminar), 2013. Disponível em: <www.aids.gov.br>. Acesso em 05 de outubro de 2014.

MORI, K. Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. **Journal of Biochemistry**, v. 146, p. 743-750, 2009.

MULVEY, M.; ARIAS, C.; MOHR, I. Maintenance of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis in herpes simplex virus type 1-infected cells through the association of a viral glycoprotein with PERK, a cellular ER stress sensor. **Journal of Virology**, v. 81, p. 3377-3390, 2007.

NCBI. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 5 de outubro de 2014a.

NCBI. Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em 5 de outubro de 2014b.

NI, M. *et al.* Regulation of PERK signaling and leukemic cell survival by a novel cytosolic isoform of the UPR regulator GRP78/BiP. **PloS one**, v. 4, p. 1-15, 2009.

ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B.; NICOTERA, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, p. 552-565, 2003.

OTTEKEN A.; EARL, P. L.; MOSS, B. Folding, assembly, and intracellular trafficking of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein analyzed with monoclonal antibodies recognizing maturational intermediates. **Journal of Virology**, v. 70, p. 3407-3415, 1996.

QIAGEN. RT² Profiler PCR Assay Data Analysis version 3.5. Disponível em: <<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>>. Acesso em 6 de outubro de 2014.

RAMBAUT, A. *et al.* The causes and consequences of HIV evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 52-61, 2004.

REDDY, R. K. *et al.* Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 20915-20924, 2003.

RON, D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 1383-1388, 2002.

RUTKEVICH, L. A.; WILLIAMS, D. B. Participation of lectin chaperones and thiol oxidoreductases in protein folding within the endoplasmic reticulum. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, p. 157–166, 2010.

RUTKOWSKI, D. T.; KAUFMAN, R. J. A trip to the ER: coping with stress. **Trends in Cell Biology**, v. 14, p. 20-28, 2004.

SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à virologia humana**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 160p.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R. J. ER stress and the unfolded protein response. **Mutation Research**, v. 569, p. 29-63, 2005.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R. J. Divergent roles of IRE1 α and PERK in the unfolded protein response. **Current Molecular Medicine**, v. 6, p. 5-36, 2006.

SCHRÖDER, M. Endoplasmic reticulum stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 862-894, 2008.

SLEASMAN, J. W.; GOODENOW, M. M. HIV-1 infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 582-592, 2003

SMITH, M. H.; PLOEGH, H. L.; WEISSMAN, J. S. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. **Science**, v. 334, p. 1086-1090, 2011.

STIRLING, P. C.; LUNDIN, V. F.; LEROUX, M. R. Getting a grip on non-native proteins. **European Molecular Biology Organization**, v. 4, p. 565-570, 2003.

SUN, F. C. *et al.* Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response. **The Biochemical Journal**, v. 396, p. 31-39, 2006.

TONELLO, Y. **Avaliação da ativação da via UPR e do perfil de citocinas séricas em indivíduos HIV soropositivos**. 2012. 54f. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, p. 1-12, 2002.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, v. 334, p. 1081-1086, 2011.

WHO. World Health Organization. **Global Summary of the HIV/AIDS Epidemic**, 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/hiv/>>. Acesso em 04 de outubro de 2014.

XU, C.; BAILLY-MAITRE, B.; REED, J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 2656-2664, 2005.

YOSHIDA, H. *et al.* XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. **Cell**, v. 107, p. 881-891, 2001.

ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. **Nature**, v. 454, p. 455-462, 2008.

ZHANG, Y. *et al.* Cell surface relocalization of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, p. 15065-15075, 2010.

ZHENG, Y. *et al.* Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response. **The Journal of Microbiology**, v. 43, p. 529-536, 2005.

ZHOU, H. *et al.* HIV protease inhibitors activate the unfolded protein response in macrophages: implication for atherosclerosis and cardiovascular disease. **Molecular Pharmacology**, v. 68, p. 690-700, 2005.

ZHOU, H. *et al.* HIV protease inhibitors activate the unfolded protein response and disrupt lipid metabolism in primary hepatocytes. **American Journal of Physiology**, v. 291, p. G1071-G1080, 2006.

ZHOU, H. *et al.* Novel mechanism of anti-apoptotic function of 78-kDa glucose-regulated protein (GRP78): endocrine resistance factor in breast cancer, through release of B-cell lymphoma 2 (BCL-2) from BCL-2-interacting killer (BIK). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 25687-25696, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Centro de Ciências Biológicas - Divisão de Imunologia
88049-900, Campus Universitário, Florianópolis, SC, Brasil

PROJETO DE PESQUISA
IMPACTO DA INFECÇÃO PELO HIV SOBRE A VIA UPR
(UNFOLDED PROTEIN RESPONSE) EM CÉLULAS DE
INDIVÍDUOS HIV POSITIVOS

RESPONSÁVEL: PROF. DR. AGUINALDO R. PINTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Justificativa: Quando uma pessoa é infectada por um vírus, as células do corpo procuram se defender deste invasor. Esta defesa tem como objetivo evitar que o vírus se multiplique dentro da célula. Além disso, toda vez que uma célula é invadida por um vírus o seu funcionamento é bastante alterado. Para fazer com que a célula volte a funcionar normalmente ela produz alguns fatores, conhecidos como fatores de resposta ao estresse. Vírus como o da hepatite C e o do herpes são oportunistas e utilizam estes fatores em seu próprio benefício. Com isso eles são capazes de escapar da defesa da célula e produzir muitos novos vírus. Quando se descobre quais fatores de defesa contra o estresse são afetados pelos vírus é possível desenvolver novos remédios, ajudando no tratamento de pessoas infectadas. Não existe nenhuma informação ainda sobre como o vírus HIV, causador da AIDS, se comporta diante destes fatores de resposta ao estresse da célula. O vírus HIV destrói células que fazem parte da defesa do organismo e por isso pessoas infectadas acabam perdendo sua proteção natural contra diversas doenças. É importante dizer que mesmo com a grande quantidade de estudos sobre o HIV ainda não existe um tratamento totalmente eficaz contra a infecção. Este estudo pretende identificar se o HIV também manipula alguns fatores de resposta ao estresse nas células. Para isso vamos comparar a presença destes fatores em células do sangue de pessoas não infectadas (grupo controle) e infectadas pelo

HIV. Dessa forma, os resultados deste estudo têm grande potencial de gerar novas informações que poderão ser utilizadas na produção de novos remédios mais eficientes contra o vírus, ajudando milhões de pessoas. Você está sendo convidado a participar deste projeto, sendo sua participação muito importante para que ele se torne possível, mas podendo você decidir se deseja participar ou não.

Procedimento: Se você voluntariamente decidir participar deste estudo, após ter lido o termo de consentimento, deverá autorizar o acesso a informações do seu prontuário médico, assim como a coleta de uma amostra do seu sangue (30 ml – mais ou menos meio copinho de café) que será utilizado nos experimentos. Isso será feito apenas uma vez e terá como objetivo avaliar como os mecanismos de resposta ao estresse se comportam em células infectadas ou não pelo HIV. Ressaltamos também que a participação neste projeto de pesquisa não alterará o esquema terapêutico prescrito pelo médico responsável.

Riscos e desconfortos: O sangue será coletado através de uma veia do seu braço por um profissional treinado e especializado. O desconforto presente neste tipo de procedimento é a picada da agulha que coletará o sangue. Um incômodo mais raro, porém possível, é o surgimento de pequenos hematomas (manchas roxas) no local da picada.

Benefícios: Os resultados dos experimentos realizados em laboratório não terão impacto imediato no seu atendimento médico e tratamento. Porém, as informações obtidas serão muito importantes para entender a relação entre o HIV e alguns fatores celulares de resposta ao estresse, podendo resultar na descoberta de novos alvos terapêuticos. Dessa forma, sua participação poderá contribuir para o desenvolvimento de novas formas de tratamento da infecção pelo HIV, o que beneficiaria milhões de pessoas soropositivas no mundo.

Direitos do Voluntário:

1. Garantia de esclarecimento e resposta a qualquer pergunta que você tiver sobre o estudo.
2. Liberdade de abandonar a presente pesquisa a qualquer momento e sem qualquer prejuízo. Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, podendo você se recusar a participar ou desistir a qualquer momento.
3. Garantia de que você não será responsável por qualquer despesa, sendo os gastos absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

4. Garantia de privacidade à sua identidade e sigilo de suas informações. Todas as perguntas feitas a você ou informações do seu prontuário e exames permanecerão sob confidencialidade, tendo acesso a elas somente você, os pesquisadores envolvidos na presente pesquisa e o Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC. O seu nome não será identificado em qualquer tipo de publicação que resulte da presente pesquisa.

Todos os itens deste termo de consentimento serão cumpridos e respeitados pelos integrantes envolvidos. Qualquer dúvida que você tiver agora ou mesmo depois de assinar este documento poderá ser respondida através do contato com qualquer um dos pesquisadores abaixo, o mesmo podendo ser feito se você quiser desistir da pesquisa.

Prof. Dr. Aginaldo Roberto Pinto – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) Fone: 3721 5206

Mariana Borsa – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) Fone: 3721 5514, email: nanaborsa@gmail.com

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, recebi uma cópia deste documento e li (ou leram para mim) as informações nele contidas. Todos os procedimentos foram explicados e justificados e as dúvidas referentes a este estudo foram esclarecidas. Sei que posso vir a entrar em contato com os pesquisadores para tirar novas dúvidas que venham a surgir. Compreendo que a amostra do meu sangue será utilizada a fim de avaliar o comportamento de alguns fatores celulares diante da infecção pelo HIV. Tenho conhecimento dos riscos e benefícios do presente estudo e também do meu direito de desistir de participar desta pesquisa a qualquer momento. Autorizo ainda publicações referentes aos resultados deste estudo, desde que respeitado o direito de confidencialidade das informações.

(Local e data)

Assinatura do voluntário ou responsável

Nome completo do voluntário:

RG/CPF:

Nome completo do responsável:

RG/CPF:

Dr. Aguinaldo R. Pinto (pesquisador responsável)

Mariana Borsa (pesquisadora)