

Jéssica Campestrini

Avaliação da ativação de mecanismos apoptóticos mediados pela via UPR (*unfolded protein response*) em células Jurkat estimuladas com a proteína Tat do HIV-1.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Biociências. Área de Concentração: Microbiologia e Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto.

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Campestrini, Jéssica

Avaliação da ativação de mecanismos apoptóticos mediados pela via UPR (unfolded protein response) em células Jurkat estimuladas com a proteína Tat do HIV-1. / Jéssica Campestrini ; orientador, Aguinaldo Roberto Pinto - Florianópolis, SC, 2017.
139 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

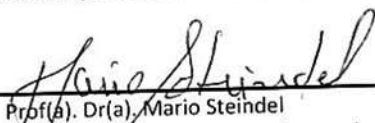
1. Biotecnologia e Biociências. 2. HIV. 3. Tat. 4. Apoptose. 5. Estresse RE. I. Pinto, Aguinaldo Roberto. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

"Avaliação da ativação de mecanismos apoptóticos mediados pela via UPR (NFOLDED PROTEIN RESPONSE) em células JURKAT estimuladas com a proteína TAT do HIV-1"

Por

Jéssica Campestrini

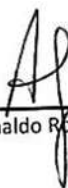
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (02/PPGBTC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



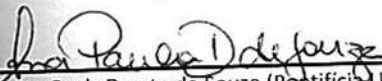
Prof(a). Dr(a). Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

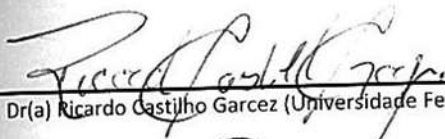
Banca examinadora:




Dr(a) Aginaldo Roberto Pinto (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr(a) Ana Paula Duarte de Souza (Pontifícia-Universidade Católica do Rio Grande do Sul)



Dr(a) Ricardo Castilho Garcez (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr(a) Célia Regina Monte Barardi (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2017.

Este trabalho é dedicado à minha família, por
todo o apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

“Há três métodos para ganhar sabedoria:
O primeiro, por reflexão, que é o mais nobre;
O segundo, por imitação, que é o mais fácil;
E o terceiro, por experiência, que é o mais amargo”.
(Confúcio)

Acredito que são as nossas escolhas que determinam qual será o método aplicado à aquisição de tal sabedoria. Dentre estes três métodos, com certeza foi o mais amargo que escolhi na maioria das vezes e eu só tenho a agradecer a todos que de alguma forma tornaram essa jornada, que muitas vezes foi amarga, em uma experiência de vida da qual tenho muito orgulho de ter vivido. Em especial, gostaria de agradecer:

Ao meu orientador Aguinaldo Roberto Pinto, por ter aceitado me orientar sem nem ao menos me conhecer e me confiar o desafio que foi a elaboração deste trabalho. Por todas as vezes que me pediu para ir “de peito aberto”, por mostrar o caminho e muitas vezes me fazer confiar mais em mim.

Aos professores do Laboratório de Imunologia Aplicada, Oscar Bruna-Romero pela disponibilidade e auxílio técnico e científico nos mais diferentes assuntos que nortearam o desenvolvimento deste trabalho, pelo incentivo, boa convivência e por todos os bons momentos compartilhados; ao professor Carlos Zanetti, pelo agradável, mesmo que esporádico convívio, por ter ajudado a “ressuscitar” as células Jurkat e principalmente por ter feito do meu estágio de docência um aprendizado que foi muito além das aulas de imunologia básica.

Aos professores do Laboratório de Protozoologia, em especial ao professor Edmundo Grisard, à professora Patrícia Stoco e ao professor Mário Steindel por todo o apoio técnico e científico e pelos momentos de descontração que fizeram muitas vezes do corredor um local cheio de vida, aliviando a tensão dos dias difícil.

As professoras Claudia Simões e Célia Barardi, do Laboratório de Virologia aplicada, por terem deixado as portas do laboratório sempre

abertas para que esse projeto pudesse ser realizado, por todo o ensinamento aplicado e por terem plantado a sementinha da preocupação com todos os menores e mais básicos detalhes do cultivo celular e da PCR em tempo-real, que fizeram com que eu tivesse um enorme cuidado com cada etapa da realização deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Imunobiologia por contribuído de diversas maneira para o enriquecimento deste trabalho. Ao professor Daniel Mansur por ter sido o relator do projeto de mestrado que deu origem a está dissertação, pelo tempo dedicado e por todos os comentários construtivos. Ao professor André Báfica, que além do apoio técnico com os experimentos, muitas vezes dedicou do seu tempo para ajudar a esclarecer as mais diversas dúvidas a respeito da citometria de fluxo.

Ao professor Carlos Zárate-Blades do Laboratório de Imunorregulação e sua esposa a professora Patrícia Dillenburg do Laboratório Células Tronco e Regeneração Tecidual, pelo olhar atencioso e pelas sugestões que contribuíram para o crescimento deste trabalho. Agradeço de uma forma especial todos os encontros do Grupo de Interesse em Imunologia, por todas as discussões que contribuíram para o amadurecimento do meu raciocínio científico.

Aos professores Ricardo Garcez (LACERT/CCB/UFSC), Célia Regina Monte Barardi (LVA/CCB/UFSC), Ana Paula Duarte de Souza (IBP/PUCRS) e Ricardo Ruiz Mazzon (CCB/UFSC) que aceitaram compor a banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar esta dissertação.

Ao corpo técnico do LAMEB por serem sempre solícitos e por toda ajuda prestada com os equipamentos durante os experimentos.

Aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências pelo bom convívio, pelo companheirismo em todas as quartas-feiras de seminários, por todas as informações e experiências compartilhadas e por me fazerem perceber que não estou sozinha, que os meus problemas, medos e angústias são os mesmos de tantos outros.

Aos meus vizinhos e amigos de corredor do LIDI, LVA, LIAA e da PROTO, pelo bom convívio, por toda a ajuda oferecida na

disponibilidade no uso dos equipamentos, no empréstimo de reagentes e pela troca de experiências e ideias nos momentos mais difíceis.

A todos os integrantes e ex-integrantes do LIA, pela amizade, pelo companheirismo e por terem feito deste tempo de convívio um enorme aprendizado: Antônio, Vinícius, Abadio, Dalila, Carlos, Sthefany, Lívia, Aline, Wellinton e Ana Clara. Agradeço especialmente à doutoranda Sthefany Pagliari por ter me recebido de braços abertos desde o primeiro dia, por compartilhar comigo a preocupação com a organização e limpeza dos laboratórios, por ter sempre uma solução MacGyverísticas para os mais diversos problemas no laboratório, por muitas vezes ter aguentado os momentos de estresse e pelos bons momentos compartilhados dentro e fora do lab.

Ao Abadio de Oliveira da Costa Junior e a Ana Clara Faria Martins, que merecem um parágrafo inteiro nessa dissertação, por terem sido muito mais do que apenas colegas de laboratório e de apartamento. Foram companheiros de convivência diária, amigos, confidentes e muitas vezes foram pai, mãe, irmão e irmã. Fizeram parte dessa fase incrível da minha vida, cheia de altos e baixos e sempre estavam lá para comemorar cada bom resultado, para dar aquele olhar reconfortante ou um abraço consolador.

As minhas amigas de infância: Jéssica, Ananda e Dandara pela amizade incondicional, por compreenderem a minha ausência e a distância, por me fazerem entender que “não precisamos mudar de amigos se compreendermos que nossos amigos mudam” e que “verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo à longas distâncias”.

Aos amigos acumulados durante a graduação e que continuam presentes na minha vida até hoje: Luana por compartilhar comigo desde os primeiros semestres da biomedicina essa vontade louca pela pesquisa, por me incentivar a entrar no mestrado e a todo o apoio desde os primeiros dias em Floripa. Ao Max, a Vanda e a Anita que mesmo de longe e com a correria do dia-a-dia acompanharam um pouco dessa caminhada.

À minha família por serem o meu refúgio, pelo amor e apoio incondicional, por sonharem os meus sonhos, festejarem à cada pequena vitória e por fazerem tudo isso ter sentido muito maior. Ao meu pai por

cada vez que perguntou se minhas células estavam vivas e se a proteína estava dando certo e à minha mãe por todas as vezes que disse que tudo iria dar certo. À minha irmã Jenifer, que é uma biomédica que me enche de orgulho e por ser companheira de todos os momentos. Ao meu irmão gêmeo (19 anos mais novo), Joaquim que é uma fonte inesgotável de alegria e inspiração e que faz meu coração doer toda vez que vou embora. À minha Ominha linda que é a melhor pessoa que conheço nesse mundo, meu maior exemplo de superação e amor. Vocês são tudo e estão em tudo o que eu faço.

Ao meu namorado, amigo e companheiro Eduardo Borck, pela paciência sem fim, pela amizade verdadeira pelo amor puro e a dedicação que supera a distância.

RESUMO

Indivíduos HIV-positivos geralmente apresentam uma elevada depleção de linfócitos T CD4. A morte de células infectadas ou não por HIV-1 é resultado, entre diversos outros fatores, da apoptose mediada por proteínas virais. Esta apoptose pode ser ativada por mecanismos extrínsecos ou intrínsecos, respectivamente através de receptores celulares ou ativação de moléculas sinalizadoras de morte. Uma das vias celulares que regula a sobrevivência ou morte da célula é a via UPR (*Unfolded Protein Response*), que regula o estresse reticular causado pelo acúmulo de proteínas mal dobradas através do bloqueio da tradução proteica, aumento da expressão de chaperonas que auxiliam no dobramento e direcionam as proteínas mal dobradas para a via de degradação de proteínas associada ao retículo (ERAD). Quando o estresse reticular é prolongado, como no caso de infecções virais, a via UPR induz apoptose através da expressão da molécula pró-apoptótica CHOP. Neste trabalho, observou-se que após 72 horas de estímulo com 200 nM da proteína Tat houve um aumento significativo na taxa de apoptose das células Jurkat (12,05%, $P < 0.0001$), indicando que provavelmente a proteína Tat exerce um efeito biológico que desencadeia o processo de apoptose. Células estimuladas também apresentam significativas alterações no perfil de transcritos dos genes que codificam as proteínas da via UPR: PERK, ATF6, IRE1, BIP, eIF2 α , XBP1-u, XBP1-s, CHOP; e genes relacionados a apoptose mediada pelo estresse de RE: ATF4, CHOP, GADD34, BIM e BCL-2. Esses resultados indicam que a proteína Tat induz alterações celulares que geram estresse no RE levando a ativação da via UPR. O aumento na transcrição de CHOP pode indicar que o estresse no RE está envolvido no mecanismo de apoptose dessas células. Foi observado ainda, que células estimuladas sofrem parada nas fases S e G2 do ciclo celular e perdem o potencial de membrana de mitocôndria, sendo esses outros possíveis mecanismos de apoptose induzido por Tat. A identificação do papel de Tat no estresse no RE com posterior indução apoptótica podem reforçar a sugestão da via UPR como um possível alvo terapêutico.

Palavras-chave: HIV; Tat; estresse de retículo; apoptose; via UPR.

ABSTRACT:

HIV-positive individuals usually have a high depletion of CD4 lymphocytes. The death of cells infected or not by the HIV is a result, among many other factors, the apoptosis mediated by viral proteins. Extrinsic or intrinsic pathways, respectively through cell surface receptors or activation of death signaling molecules, can trigger apoptosis cell death. The Unfolded Protein Response (UPR) is one of the cellular pathways that regulate cell survival or cell death. UPR also regulates the Endoplasmic Reticulum (ER) stress caused by the accumulation of misfolded or unfolded protein, by blocking the cell protein translation, increased expression of chaperones that assist in protein folding and lead misfolded proteins for the degradation pathway associated with the ER. When the ER stress is prolonged, as in the case of viral infections, the UPR induces apoptosis through the expression of pro-apoptotic molecule CHOP. In the present work, it was observed that after 72 hours of stimulation with 200nM of Tat protein there was a significant increase in apoptosis rate in Jurkat cells (12,05%, $p < 0.0001$), indicating that Tat protein most likely exerts a biologic effect which triggers the apoptosis pathway. Cells stimulated also showed significant changes in transcription profile of genes encoding proteins of the UPR pathway: PERK, ATF6, IRE1, BIP, eIF2 α , XBP1-u, XBP1-s, CHOP; and the genes related to ER stress-mediated apoptosis: ATF4, CHOP, GADD34, BIM e BCL-2. The increase in CHOP transcription may indicate that the ER stress is involved in the mechanisms that induces apoptosis in Jurkat cells. Furthermore, Tat stimulation induces cell cycle arrest and loss of mitochondrial membrane potencial in Jurkat cells. Identification the role of Tat in ER stress-induced apoptosis may reinforce the suggestion of the UPR pathway as a possible therapeutic target.

Key words: HIV; Tat; Er stress; apoptosis; UPR pathway.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada/MIP/CCB/UFSC, sob orientação do Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto, com recursos financeiros da Fundação de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Ativação da via UPR. PERK atua na fosforilação do fator eIF2 α , levando à inibição global da tradução e simultâneo aumento seletivo da tradução do fator de transcrição ATF4 que induz a expressão de genes envolvidos na ativação da via UPR; ATF6 é ativada após a clivagem e migração até o complexo de Golgi, onde é liberada na sua forma citoplasmática e tem como principal função induzir um aumento da expressão de XBP-1; IRE1 é responsável pelo processamento do RNAm de XBP-1, levando-o à sua forma ativa XBP-1s que atua como fator de transcrição nuclear.

Figura 02. Indução de apoptose mediada pela ativação da via UPR. A via de morte celular induzida pelo estresse de RE ocorre de maneira ainda pouco compreendida. A indução de estresse, que pode ser causada pela liberação de cálcio, pode estar relacionado com a translocação dos fatores apoptóticos BAX/BAK do RE para a mitocôndria, bem como pela ativação de caspase-12 em resposta ao estresse de RE. A ativação de IRE1 que pode ser auxiliada pelo complexo pró-morte BAX/BAK, induz ativação da quinase N-terminal Jun (JNK) que contribui no processo de morte através da inativação da proteína anti-apoptótica BCL-2. PERK induz a fosforilação do fator eIF2 α que pode atuar inibindo a síntese de proteínas pró-sobrevivência e induz a tradução seletiva de ATF4, que conseqüentemente induz a transcrição do fator pró-apoptótico CHOP. CHOP por pode atuar de duas maneiras: uma delas é na repressão da atividade e na expressão da molécula BCL-2 e a outra é na diminuição da transcrição de GADD34 que está envolvido na indução de apoptose.

Figura 03. Estrutura gênica e conformacional da proteína Tat. (A) Esquema da organização dos genes virais que apresenta duas regiões LTR nos terminais 3' e 5' do genoma, entre eles estão os genes estruturais: gag, pol e env; genes acessórios: vif, vpr, vpu e nef; e genes regulatórios: tat e rev. (B) Possível conformação da estrutura tridimensional da proteína Tat do subtipo C do HIV, com base na sua composição aminoacídica.

Figura 04. Atuação da proteína Tat nas células infectadas e em células-alvo através do efeito *bystander*. Em células infectadas a proteína Tat produzida no citoplasma pode seguir dois destinos: 1) atravessar a membrana nuclear e ligar-se na região LTR do genoma viral promovendo aumento na transcrição gênica ou ligar-se na região TAR do mRNA viral impedindo a formação de um *hairpin* e induzir aumento na tradução do mesmo; 2) a proteína Tat pode ser excretada das células infectadas, entrar em células-alvo vizinhas através de endocitose, e nessas células a proteína Tat também é direcionada ao núcleo e na ausência da região LTR viral, a proteína liga-se ao promotor de diversos genes celulares, promovendo aumento na transcrição dos mesmos.

Figura 05. Fluxograma do delineamento experimental.

Figura 06. Determinação do número de células Jurkat estimuladas com a proteína Tat. Distribuição do número total de células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle negativo e células estimuladas com 1 μ M de etoposídeo representam o controle positivo. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (***) representa $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$.

Figura 07. Determinação dos *gates* para análise de apoptose em células Jurkat. Análise de apoptose em células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat, realizada com base nos *gates* demonstrando a frequência dos eventos em *Dneg* indicando células viáveis, *Early apoptosis* células em estágio inicial de apoptose, *Late apoptosis* células em estágio tardio de apoptose e *Necrosis* células em processo de necrose. (A) Células Jurkat tratadas com Etoposídeo, demonstrando o controle positivo de apoptose; (B) células Jurkat sem estímulo representando o controle negativo; (C) células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas.

Figura 08. Curva dose-resposta e cinética de células Jurkat estimuladas com a proteína Tat. Avaliação da porcentagem de células Jurkat em processo de apoptose estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. O controle negativo representado por células sem estímulo e células estimuladas com 1 μ M de etoposídeo representam o controle positivo.

Figura 09. Indução de apoptose em células Jurkat estimuladas com 200nM de proteína Tat. Avaliação da porcentagem de células Jurkat em processo de apoptose estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas de estímulo. O controle negativo representado por células sem estímulo e células estimuladas com 1 μ M de etoposídeo representam o controle positivo. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$ e ns é não significativo.

Figura 10. Determinação da distribuição média da população de células Jurkat. Análise de distribuição realizada com base no *dotplot* demonstrando alterações nas distribuições e nas medianas dos eventos em função do tamanho (FSC-A) e a complexidade intracelular (SSC-A) de células Jurkat sem estímulo e células estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas.

Figura 11. Análise da variação de tamanho e complexidade em células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat. Alterações nas medianas de distribuição dos eventos em função do tamanho e a complexidade intracelular de células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas. O controle negativo representado por células sem estímulo. A diferença

significativa foi observada através da comparação múltipla onde (*) $p < 0,01$ e (**) $p < 0,0017$.

Figura 12. Avaliação morfológica por microscopia de fluorescência de células Jurkat estimuladas com a proteína Tat. (A) Células Jurkat sem estímulo, consideradas como controle negativo; (B) Células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas. As células foram marcadas com 300 nM de DAPI observadas em objetiva de aumento 100x através da microscopia de fluorescência utilizando filtro de 420 nm.

Figura 13. Determinação da frequência de células Jurkat em diferentes fases do ciclo celular. (A) Representação da seleção do *gate* e a distribuição dos eventos em função do tamanho (FSC-A) e a complexidade intracelular (SSC-A) de células Jurkat estimuladas ou não com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas. (B) Demonstração das fases do ciclo celular com base nos níveis de fluorescência de células marcadas com iodeto de propídeo e a frequência das células em cada fase. Sub-G1: morte celular; G1: células em repouso; S: células em processo de replicação do material genético; G2: células em processo de divisão celular.

Figura 14. Análise da alteração nas fases do ciclo celular em células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat. Número de células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas em cada fase do ciclo celular. O controle negativo representado por células sem estímulo e células estimuladas com 1 μ M de etoposídeo representam o controle positivo. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$.

Figura 15. Representação da análise de despolarização de membrana de mitocôndria de células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat. (A) *Dotplot* demonstrando a distribuição das células por tamanho (SSC-A) e níveis de fluorescência da sonda *MitoView-APC* e a seleção dos *gates* de células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat e células sem estímulo após incubação de 72 horas. (B) Histograma demonstrando a frequência de células de acordo com os níveis de fluorescência da sonda, onde *loss* $\Delta\Psi$ m indica a perda do potencial de membrana e $\Delta\Psi$ m a integridade da mesma.

Figura 16. Índice de despolarização de membrana mitocondrial em células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat. Células Jurkat foram estimuladas ou não com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas e foi avaliado se houve despolarização da membrana de mitocôndria (Perda $\Delta\Psi$ m) ou se células mantiveram integridade membranar ($\Delta\Psi$ m). A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (**) $p < 0,001$.

Figura 17. Unidade de fluorescência produzida pela atividade de caspase-12 em células Jurkat estimuladas com a proteína Tat. Índice de atividade de

caspase-12 em 2×10^6 células estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas; o controle são células sem estímulo. A diferença significativa foi observada através do teste t não-pareado onde (**) $p < 0,0092$.

Figura 18. Unidade de fluorescência produzida pela atividade de caspase-3 em células Jurkat estimuladas com a proteína Tat. Índice de atividade de caspase-3 em 2×10^6 células estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas; o controle são células sem estímulo. A diferença significativa foi observada através do teste t não-pareado onde (**) $p < 0,0011$.

Figura 19. Unidade de fluorescência produzida pela atividade de caspase-8 em células Jurkat estimuladas com a proteína Tat. Índice de atividade de caspase-8 em 2×10^6 células estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas; o controle são células sem estímulo. A diferença significativa foi observada através do teste t não-pareado onde (***) $p < 0,00010$.

Figura 20. Análise da especificidade dos iniciadores dos genes da via UPR. Perfis das curvas de dissociação dos genes de ativação da via UPR (PERK, ATF6, IRE1, BIP, eIF2 α , ATF4, XBP1-u e XBP1-s).

Figura 21. Análise da especificidade dos iniciadores dos genes da via de apoptose. Perfis das curvas de dissociação dos genes relacionados a apoptose mediada pela ativação da via UPR (CHOP, GADD34, BIM e BCL-2).

Figura 22. Análise da especificidade dos iniciadores dos genes normalizadores. Perfis das curvas de dissociação dos genes de referência (TBP, B2M e RPL).

Figura 23. Análise da estabilidade dos genes de referência em células Jurkat. Gráfico gerado pela ferramenta online *RefFinder* indicando a combinação mais estável dos genes em células Jurkat, R: RPL, T: TBP e B: B2M.

Figura 24. Análise da expressão relativa do gene de ATF6. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$, (***) $p < 0,001$ e ns não significativo.

Figura 25. Análise da expressão relativa do gene de PERK. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$, (***) $p < 0,001$, (*) $p < 0,01$ e ns não significativo.

Figura 26. Análise da expressão relativa do gene de IRE1. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$, (**) $p < 0,001$ e ns não significativo.

Figura 27. Análise da expressão relativa do gene de BIP. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$, (**) $p < 0,001$, (*) $p < 0,01$ e ns não significativo.

Figura 28. Análise da expressão relativa do gene de eIF2 α . Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$, (*) $p < 0,01$ e ns não significativo.

Figura 29. Análise da expressão relativa do gene de XBP1-u. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$, (*) $p < 0,01$ e ns não significativo.

Figura 30. Análise da expressão relativa do gene de XBP1-s. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$, e ns não significativo.

Figura 31. Análise da expressão relativa do gene de ATF4. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,00001$ (****) $p < 0,0001$, (**) $p < 0,001$, (*) $p < 0,01$ e ns não significativo.

Figura 32. Análise da expressão relativa do gene de CHOP. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,00001$ e ns não significativo.

Figura 33. Análise da expressão relativa do gene de GADD34. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,00001$ e ns não significativo.

Figura 34. Análise da expressão relativa do gene de BIM. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,00001$, (**) $p < 0,001$ e ns não significativo.

Figura 35. Análise da expressão relativa do gene de BCL-2. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,00001$, (**) $p < 0,001$ e ns não significativo.

Figura 36. Visão geral da hipótese deste trabalho com base nos resultados obtidos. A proteína Tat atua aumentando a transcrição de diversos genes celulares que culmina num aumento na carga de proteínas a serem dobradas no RE, gerando assim estresse de RE com conseqüente ativação dos três braços da via UPR (PERK, ATF6 e IRE1). PERK tem sua expressão aumentada, induzindo a fosforilação de eIF2 α gerando uma atenuação global da síntese proteica na tentativa de reduzir a quantidade de proteínas a serem dobradas no RE, no entanto induz seletivamente o aumento da tradução de ATF4. ATF4 atua como fator de transcrição induzindo a expressão de CHOP, que irá induzir a transcrição de GADD34. GADD34 por sua vez induz a reativação de eIF2 α reestabelecendo a tradução proteica e promovendo aumento do estresse no RE. O aumento na expressão de CHOP induz ativação da caspase-12 iniciadora que está relacionada à membrana do RE que por sua vez induz ativação da caspase-3 diretamente responsável pela morte celular. O braço de ATF6 induz o splicing alternativo da molécula XBP-1, dessa forma aumenta a expressão de XBP1-s e diminui a expressão de XBP1-u. No braço de IRE1, a molécula XBP1-s é

processada e direcionada para o núcleo onde induz a expressão da chaperona BiP. IRE1 também pode formar um complexo com as proteínas ASK e JNK, atuando na indução da transcrição de CHOP que atuará desregulando o equilíbrio entre as moléculas pró e anti-apoptóticas (BIM e BCL2) e dessa forma induzindo a ativação de apoptose. Além disso, CHOP também pode estar envolvido na parada do ciclo celular em células estimuladas com a proteína Tat. A parada nas fases S e G2 do ciclo celular promovem alterações celulares como o aumento do tamanho e da complexidade intracelular, bem como provocam a diminuição na proliferação celular. Durante o estresse de RE observado através da ativação da via UPR, o acúmulo de proteínas induz o extravasamento de Ca^{2+} da membrana do RE, o Ca^{2+} citoplasmático é captado pela mitocôndria induzindo despolarização de membrana de mitocôndria, que induzirá a apoptose através da liberação de citocromo C e ativação das caspases -12 e -3.

Figura S01. Viabilidade de células Jurkat após 72 de incubação. Avaliação da porcentagem de células viáveis após 72 horas de incubação com plaqueamento inicial de diferentes densidades celulares, 2×10^5 , 5×10^5 ou 1×10^6 . A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (***) $p < 0,00001$.

Figura S02. Viabilidade de células Jurkat após 72 de incubação. Avaliação da porcentagem de células viáveis após 72 horas de incubação com plaqueamento utilizando meio RPMI 1640 com $10 \mu\text{M}$ ou $25 \mu\text{M}$ de HEPES. A diferença significativa foi observada utilizando o teste t onde (**) $p = 0,0036$.

Figura S03. Curva de viabilidade de células Jurkat. Análise da viabilidade celular em função do tempo de incubação (24, 48 ou 72 horas) em placas com 6, 12 ou 24 poços. A diferença significativa foi observada através da análise múltipla onde (**) $p = 0,0136$.

Figura S04. Curva de crescimento de células Jurkat. Análise do crescimento celular em função do tempo (24, 48 ou 72 horas) em três diferentes tamanhos de placas com 6, 12 ou 24 poços. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,00001$, (**) $p < 0,001$ e ns não significativo.

Figura S05. Avaliação da distribuição e frequência das células Jurkat nos gates. Gráfico *dotplot* demonstrando a distribuição em função do tamanho (FSC-A) e a complexidade intracelular (SSC-A) em garrafa de cultura e placa de 12 poços e a frequências de eventos nos *gates* (A) representando o canal de morte e em (B) representando células viáveis.

Figura S06. Determinação da frequência de células Jurkat em processo de apoptose através da marcação celular com Anexina-V e PI. (A) representa a seleção do gate e a distribuição dos eventos em função do tamanho (FSC-A) e a

complexidade intracelular (SSC-A) em garrafa de cultura e placa de 12 poços; em (B) apresentado pelo dotplot demonstrando a frequências das células viáveis (Q4), células em processo inicial de apoptose (Q3), células em processo tardio de apoptose (Q2) e células em processo de necrose (Q1).

Figura S07. Viabilidade de células Jurkat após 72 horas de incubação. Análise da porcentagem de células viáveis e células em mortas, obtidas a partir da marcação celular com anexina-V e Pi. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde ns considera-se não significativo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Valores dos coeficientes de correlação (R^2), inclinação da reta, Y-interceptação, eficiência e ponto de corte dos pares de iniciadores.

LISTA DE QUADROS

Quadro 01. Características dos iniciadores utilizados para análise de expressão relativa dos genes de interesse.

Quadro 02. Características dos iniciadores utilizados para análise de expressão relativa dos genes de referência.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANOVA – Análise de Variância
APC – Aloficocianina
ATF4 – do inglês, *activating transcription fator 4*
ATF6 – do inglês, *activating transcription fator 6*
ATP – adenosina trifosfato
B2M – Beta 2 microglobulina
BAK – do inglês, *Bcl-2 homologous antagonist/ killer*
BAX – do inglês, *Bcl2-associated X protein*
BCL-2 – do inglês, *B-cell lymphoma 2*
BCL-XL – do inglês, *Bcl-2-like 1*
BIK – do inglês, *Bcl2-interacting killer*
BIM – do inglês, *Bcl2-interacting mediator of cell death*
BiP – do inglês, *immunoglobulin binding protein*
CHOP – do inglês, *CCAAT/Enhancer-binding protein homologous protein*
bZIP- do inglês, *basic leucine zipper domain*
CCR5 - Receptor de quimiocina C-C do tipo 5
CMV – citomegalovírus
CO₂ – Dióxido de carbono
Cq – Ciclo de quantificação
CITc – Citocromo c
CXCR4- Receptor de quimiocina C-X-C do tipo 4
DDIT3 EBV – vírus Epstein-Barr
DENV – vírus da dengue
DNA – ácido desoxirribonucleico
EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético
eIF2 α – do inglês, *eukaryotic initiation factor 2*
ENDOG- Endonucleases G
ERAD – do inglês, *ER associated degradation*
FACS- Fluorescente Activated Cell Sorter
FSC – do inglês, *Forward Scatter*
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
Fw – Senso (do inglês, *foward*)
EV71 – enterovírus 71
GADD34 – do inglês, *growth arrest and DNA damage-inducible protein*

GADD153 – do inglês, *growth arrest and DNA damage-inducible protein 153*
GRP – do inglês, *glucose related protein*
HBMEC- do inglês, *human brain microvascular endothelial cells*
HCV – vírus da hepatite C
HSPGs- Heparan Sulphate Proteoglycans
HIV – vírus da imunodeficiência humana
HSV-1 – vírus herpes simplex-1
IAF – Fator indutor de apoptose
IFNAR1 – receptor de interferon cadeia alpha/beta
IL – Interleucina
IRE1 – do inglês, *inositol requiring protein*
kDa – kilodalton
LPR – Receptor relacionado a lipoproteína
LTR – do inglês, *Long term repeat*
MHC – do inglês, *major histocompatibility complex*
mM – milimolar
MOMP- Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
nm – nanômetros
nM – nanomolar
PBS – Tampão fosfato
NOXA – do inglês, *neutrophil NADPH oxidase factor*
PBMcs – do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PERK – do inglês, *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*
PerCP- Peridina Clorofil 2
PI – iodeto de propideo
PKR – do inglês, *RNA like endoplasmic reticulum kinase*
PTPC – Complexo do poro de transição da permeabilidade
PUMA – do inglês, *p53 up-regulated modulator of apoptosis*
qPCR – PCR quantitativa em tempo real
RE – retículo endoplasmático
ROS – do inglês, *reactive oxygen species*
RNA – ácido ribonucleico
RPL13A – do inglês, *ribosomal protein L13a*
RT-qPCR – qPCR precedida de Transcrição Reversa
Rv – Antissenso (do inglês, *reverse*)
SBF – soro bovino fetal
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
SSC – do inglês, *Side Scatter*

TARV – Terapia antirretroviral
TBP – do inglês *TATA box binding protein*
TNF- α – fator de necrose tumoral alfa
TRAF – do inglês, *tumor necrosis fator receptor-associated factor 2*
TRAIL – Ligante do fator de indução de apoptose
 μ g – micrograma
 μ M – micromolar
 μ l – microlitro
UBC – Ubiquitina C
UPR – do inglês, *unfolded protein response*
WNV – vírus do oeste do Nilo
XBP-1 – do inglês, *X-box binding protein 1*
XBP-1s – do inglês, *X-box binding protein 1 splicing*
XBP-1u – do inglês, *X-box binding protein 1 unspliced*
x g – força gravitacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Estresse no Retículo Endoplasmático e via UPR (<i>Unfolded Protein Response</i>)	1
1.2. Caracterização e ativação da via UPR	3
1.3. Via UPR e apoptose	6
1.4. Infecções virais e ativação da via UPR	9
1.5. Efeitos da proteína Tat na patogênese da infecção pelo HIV	11
2 HIPÓTESE	16
3 OBJETIVO	117
3.1 Objetivo Geral	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4 METODOLOGIA	18
4.1 Delineamento experimental	18
4.2 Cultura celular e padronização das condições experimentais	18
4.3 Determinação da taxa de apoptose	19
4.3.1 Marcação e aquisição celular	19
4.3.2 Determinação da estratégia de <i>gates</i>	20
4.4 Análise da morfológica celular	20
4.5 Avaliação da permeabilidade e integridade da membrana mitocondrial	20
4.6 Avaliação da atividade de caspases	21
4.6.1 Avaliação da atividade da Caspase-3	21
4.6.2 Avaliação da atividade da Caspase-8	21
4.6.3 Avaliação da atividade da caspase-12	22
4.7 Avaliação dos níveis de transcritos gênicos	22
4.7.1 Extração e purificação do RNA total	22

4.7.2	Tratamento com DNase	23
4.7.3	Quantificação do RNA total e síntese do DNA complementar (cDNA)	23
4.7.4	Escolha dos iniciadores	24
4.7.5	Análise da eficiência e especificidade dos iniciadores..	25
4.7.6	Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)..	31
4.8	Análise do bloqueio do ciclo celular	31
4.9	Análise estatística	32
5	RESULTADOS	31
5.1	Curva dose-resposta e cinética do estímulo com a proteína Tat do HIV-1	33
5.2	Análise da indução de apoptose em células estimuladas com proteína Tat	37
5.3	Análise da morfologia celular	38
5.4	Análise da alteração nas fases do ciclo celular	43
5.5	Análise da despolarização de membrana de mitocôndria	46
5.6	Avaliação da ativação de caspase -12, -3 e -8	48
5.7	Avaliação dos níveis de transcritos de genes da via UPR	51
5.7.1	Análise de especificidade e eficiência dos iniciadores para qPCR e escolha dos genes de referência.....	51
5.7.2	Análise do nível de transcritos por RT-qPCR dos genes da via UPR	57
5.7.3	Análise do nível de transcritos por RT-qPCR dos genes relacionados a indução de apoptose mediada pelo RE	65
6	DISCUSSÃO	71
7	SUMÁRIO DE RESULTADOS	85
8	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
9	PERSPECTIVAS	89
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
11	MATERIAL SUPLEMENTAR	107

11.1	Padronização das condições ideais de cultura das células Jurkat	107
11.1.1	Padronização do número inicial de célula.....	107
11.1.2	Padronização das concentrações de bicarbonato de sódio e HEPES	108
11.1.3	Padronização do tamanho da placa	109
11.1.4	Padronização da concentração de SBF	112
11.1.5	Validação das condições padronizadas	112
11.1.6	Determinação da taxa basal de apoptose.....	113
11.2	Determinação da concentração molar de proteína Tat.....	116

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estresse no Retículo Endoplasmático e via UPR (*Unfolded Protein Response*)

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela que desempenha quatro funções fisiológicas principais: i) síntese de todas as proteínas que são secretadas e das que constituem as membranas das organelas e a membrana citoplasmática; ii) o local onde a maioria das proteínas são dobradas em suas conformações nativas, sendo que algumas delas sofrem modificações pós-traducionais como a adição das pontes dissulfeto, adição de aspargina e N-glicosilação; iii) em eucariotos superiores, também é o local de estocagem de Ca^{2+} intracelular e iv) a membrana do RE está envolvida na biossíntese de lipídeos e esteróis (KAUFMAN, 2002; SCHRODER, 2008; YOSHIDA, 2007). O RE depende de um sistema eficaz de proteínas chaperonas, elevados níveis de cálcio e um ambiente altamente oxidativo para desempenhar suas funções com eficiência (KAUFMAN, 2002). As chaperonas promovem o dobramento de proteínas através da interação preferencial com as superfícies hidrofóbicas de proteínas desdobradas. Dessa forma, protege as proteínas desdobradas da interação entre elas, evitando a agregação e criando um ambiente particular de dobramento (SCHRODER, 2008).

Dentro do RE as chaperonas estão organizadas em um complexo formado por diversas proteínas, tais como GRP78 (do inglês, *Glucose Related Protein* 78 kDa), GRP170, GRP94, calnexina e calreticulina (RUDDOCK; MOLINARI, 2006; WATANABE et al., 1994). Enquanto as chaperonas GRP94 preferencialmente atuam no dobramento de proteínas parcialmente dobradas, a chaperonas GRP78 tenta atuar em proteínas completamente desdobradas ou cadeias polipeptídicas desestruturadas (SCHRODER, 2008). GRP78 também conhecida como BiP (do inglês, *Binding Protein*) é uma proteína da família das *Heat-hock proteins*, com aproximadamente 78 kDa e é a principal chaperona localizada no RE (AYAUB et al., 2016; HENDERSHOT et al., 1996). BiP liga-se a região hidrofóbica das proteínas desdobradas através de um domínio de ligação ao substrato. Dessa forma facilita o dobramento através da mudança conformacional gerada pela hidrólise do ATP, pelo seu domínio ATPase (COSTA; DA ROSA; DE CAMARGO, 2011; SCHRODER, 2008).

Além de participarem do dobramento de proteínas no RE, as chaperonas também atuam em um mecanismo de controle de qualidade

das proteínas recém-formadas. Este controle visa garantir que apenas as proteínas corretamente dobradas serão transportadas para o complexo de Golgi. As proteínas desdobradas ou mal dobradas que não passam no controle de qualidade, são acumuladas no interior do RE, onde sofrem ubiquitinação, sendo posteriormente retrotranslocadas para o citoplasma onde entram na via de degradação de proteínas associada ao RE (ERAD) (COSTA et al., 2011; KAUFMAN, 2002; YOSHIDA, 2007).

Situações de estresse no RE podem ser resultado de condições patológicas como hipóxia, depleção de cálcio, infecções virais ou agentes químicos levam ao acúmulo de proteínas mal dobradas (KAUFMAN, 2002; YOSHIDA, 2007). O estresse no RE é determinado pelo desequilíbrio entre a carga de proteínas produzidas e a capacidade da maquinaria celular de dobrá-las corretamente (WALTER; RON, 2011). O acúmulo de proteínas desdobradas forma agregados que são altamente tóxicos e podem levar a célula à apoptose (PATIL; WALTER, 2001).

Na tentativa de aliviar o estresse no RE e reestabelecer a homeostasia, as células eucariontes ativam uma série de mecanismos celulares de autodefesa denominados *Unfolded Protein Response* (UPR). Esse mecanismo consiste em uma via de sinalização celular tempo-dependente ativada em resposta ao acúmulo de proteínas no interior do RE. O principal objetivo da ativação dessa via, é promover o dobramento correto e exportar a carga de proteínas acumuladas e dessa forma reestabelecer a homeostasia celular (COSTA et al., 2011; KAUFMAN, 2002; WALTER; RON, 2011; YOSHIDA, 2007). Para reestabelecer a homeostasia, em primeiro lugar há uma adaptação transitória que visa a redução na quantidade de proteínas que entram no RE, obtida através da atenuação da síntese proteica. A segunda ativação tem como objetivo aumentar a capacidade do RE em dobrar as proteínas nascentes, sendo uma adaptação a longo prazo que envolve o aumento na transcrição das chaperonas. Por fim ocorre o aumento da degradação das proteínas desdobradas e mal dobradas através do mecanismo de ERAD. Caso estes mecanismos não sejam suficientes para reestabelecer a homeostasia no RE, a via UPR pode alterar seu fenótipo de pró-sobrevivência e iniciar a ativação de uma via apoptótica, que tem como objetivo eliminar as células não sadias (KAUFMAN, 2002; SCHRODER, 2006).

1.2. Caracterização e ativação da via UPR

Inseridas na membrana do RE estão três diferentes classes de proteínas transmembrans conhecidos como “sensores de estresse no RE”: proteína quinase transmembrana do tipo I (PERK), endoribonucelase de transmembrana do tipo I (IRE1) e o fator 6 de ativação da transcrição (ATF6). A ativação destas três moléculas dá início à uma série de ativações subsequentes que acontecem em forma de cascata e a atuação sinérgica dessas três moléculas culminam na ativação dos genes que codificam proteínas importantes da via UPR. Além de ativar a transcrição dos genes das chaperonas, também ocorre a inibição geral, porém seletiva, da expressão gênica na tentativa de diminuir o fluxo de proteínas recém-formadas para o interior do RE e dessa forma juntamente com as chaperonas, aumentar a capacidade de dobramento e reestabelecer a homeostasia (KAUFMAN, 2002; WALTER; RON, 2011).

PERK é uma proteína quinase transmembrana de 150kDa localizada no ER. Sua porção lumial está envolvida na detecção de proteínas desdobradas, enquanto a porção citoplasmática contém o domínio quinase. Durante ativação da via UPR, PERK é ativada após sofrer oligomerização e auto fosforilação, em decorrência dessa ativação, seu domínio quinase que é capaz de fosforilar a serina 51 do fator de iniciação da tradução eIF2 α (HARDING et al., 2003; WALTER; RON, 2011; YOSHIDA, 2007). A adição do grupo fosfato ao eIF2 α leva a sua inativação e inibe a interação entre as duas subunidades ribossomais, com conseqüente inibição geral da síntese proteica (WALTER; RON, 2011). Apesar da redução geral da tradução causada pela fosforilação, eIF2 α também induz aumento da expressão de alguns RNA mensageiros, como o fator de transcrição ATF4. Este fator é uma proteína de 39 kDa que regula os promotores de genes envolvidos na via UPR, incluindo o gene codificantes para chaperonas BiP (HARDING et al., 2003). ATF4 contribui na tentativa de reestabelecer a homeostasia através do aumento na capacidade de dobramento de proteínas no RE. O papel de PERK na indução de apoptose ainda é incerto. Porém, sabe-se que a fosforilação de eIF2 α tem atividade anti apoptótica em situações de estresse no RE. No entanto, inibição geral da síntese proteica é também incompatível com a manutenção da homeostasia e induz a célula à autofagia. Acredita-se que em um contexto onde a autofagia é a última estratégia antes de apoptose, a ativação de PERK pode estar mais relacionada com a sobrevivência do que com a morte celular (BOYCE

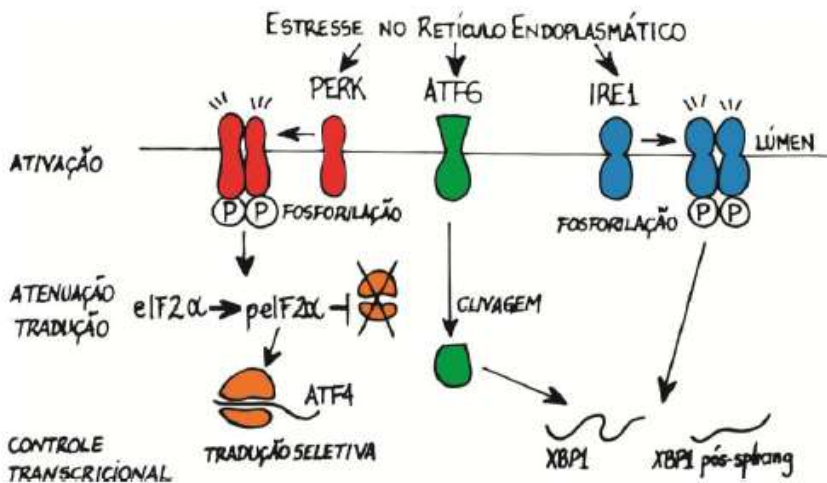
et al., 2005). ATF4 também induz a expressão de genes envolvidos na indução de apoptose, entre eles estão: CHOP (do inglês *C/EBP homologous protein*), um fator de transcrição envolvido na indução de apoptose e GADD34 (do inglês *growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*) (SCHRODER, 2006; WALTER; RON, 2011; YOSHIDA, 2007).

A proteína IRE1 transmembrana do tipo I, codificado pelos genes IRE1 α e IRE1 β , possui aproximadamente 100kDa (KAUFMAN, 2002) e apresenta uma porção lumial muito parecida com a de PERK, sendo também capaz de perceber o estresse no RE, enquanto a porção citoplasmática apresenta dois domínios, um quinase e outro ribonuclease (RNase). Durante o estresse BiP dissocia-se de IRE1 sofrendo dimerização e fosforilação e leva a ativação do domínio RNase. Quando ativado, esse domínio catalisa a remoção de um íntron de 26 nucleotídeos do mRNA da *X-box-binding-protein 1* (XBP-1), que altera sua fase de leitura na tradução e gera uma proteína de aproximadamente 41 kDa que atua na ativação da transcrição de componentes da ERAD e aumenta a expressão de chaperonas. IRE1 também é capaz de atuar de maneira muito semelhante ao TRAF2 (fator 2 associado ao receptor de TNF), na ativação de quinases envolvidas na imunidade, inflamação e apoptose além de regular as proteínas da família Bcl-2, que coordenam o mecanismo de morte programada (TRAVERS et al., 2000; URANO et al., 2000; YOSHIDA, 2007).

O terceiro braço da via UPR é ativado por ATF6, uma proteína transmembrana do tipo II de 90 kDa, cuja porção lumial é capaz de identificar o acúmulo de proteínas mal dobradas ou desdobradas (SCHRODER; KAUFMAN, 2006). A porção citoplasmática apresenta um domínio de ligação ao DNA contendo um zíper de leucina-básica e um domínio de ativação da transcrição. Na ausência de estresse no retículo, BiP se mantém ligado ao domínio lumial de ATF6 e esconde o sinal de endereçamento para o complexo de Golgi. Em resposta ao acúmulo de proteínas, BiP também se dissocia de ATF6 e liga-se nas proteínas desdobradas. Sua ativação, ao contrário de PERK e IRE1, não ocorre através de oligomerização, mas quando a interação com BiP é rompida e ATF6 tem seu sinal de endereçamento exposto e pode ser translocado ao complexo de Golgi (RUTKOWSKI; KAUFMAN, 2004; WALTER; RON, 2011; YOSHIDA, 2007). No complexo de Golgi, ATF6 sofre clivagens sequenciais por proteases que removem o domínio lumial e liberam fragmentos N-terminal ATF6(N), esses fragmentos são

direcionados para o núcleo e ativam genes alvo da via UPR. Os principais genes ativados são as enzimas dissulfeto isomerases (PDI), as chaperonas BiP e calreticulinas (WALTER; RON, 2011; YOSHIDA, 2007).

As três vias de sinalização UPR descritas na Figura 01 também são responsáveis pela indução de CHOP, também conhecido como DDIT3 ou GADD153, uma molécula pró-apoptótico (Rutkowski & Kaufman, 2004). O promotor do gene CHOP possui sítios de ligação para todos os maiores indutores da via UPR, incluindo ATF4, ATF6 e XBP-1. Estudos indicam que esses componentes possuem influência na ativação e expressão do fator de transcrição CHOP (OYADOMARI; MORI, 2004). Dessa forma, a via UPR pode ser vista tanto quando uma via ativada na tentativa de reestabelecer a homeostasia da célula quanto, em últimos casos, uma via de apoptose.



Marina Borsa, 2012.

Figura 01. Ativação da via UPR. PERK atua na fosforilação do fator eIF2 α , levando à inibição global da tradução e simultâneo aumento seletivo da tradução do fator de transcrição ATF4 que induz a expressão de genes envolvidos na ativação da via UPR; ATF6 é ativada após a clivagem e migração até o complexo de Golgi, onde é liberada na sua forma citoplasmática e tem como principal função induzir um aumento da expressão de XBP-1; IRE1 é responsável pelo processamento do RNAm de XBP-1, levando-o à sua forma ativa XBP-1s que atua como fator de transcrição nuclear.

1.3. Via UPR e apoptose

A decisão entre vida ou morte celular baseada em uma avaliação sobre se o estresse no RE será atenuado em tempo hábil, pode explicar o papel central da via UPR em diversas doenças. Se a ativação da via UPR não for capaz de reprimir o estresse gerado e reestabelecer a homeostasia, uma via de morte programada será desencadeada para garantir a sobrevivência do organismo como última forma de defesa (SANO; REED, 2013; WALTER; RON, 2011; YOSHIDA, 2007). Apoptose é um processo conservado de morte celular programada, composto por um complexo ativado em cascata estreitamente sincronizado e que interage em um ambiente controlado e geneticamente regulado, que está pronto para exercer sua função após receber o estímulo de morte celular (GROENENDYK; MICHALAK, 2005).

A via de apoptose mais bem descrita relacionada ao estresse no RE é a induzida por CHOP, conforme demonstrado na Figura 02. Estudo recentes demonstram que uma via de sinalização mediada pela via UPR através de CHOP-ATF4 induzem a ativação de proteínas pró-apoptóticas (GALEHDAR et al., 2010; GHOSH et al., 2012; MCCULLOUGH et al., 2001). CHOP é um fator de transcrição do tipo bZIP induzido pelos 3 braços da via UPR: ATF6, PERK-eIF2 α -ATF4 e IRE1-ASK1-MAPK (CHEN, G. et al., 2007; YOSHIDA, 2007; ZINSZNER et al., 1998). A persistência da agregação proteica leva a sinalização que induz a alteração do fenótipo de pró-sobrevivência para o pró-apoptótico, sendo nesse estágio que a expressão de CHOP é aumentada e desencadeia o processo de morte celular (GALLUZZI et al., 2012; MA, R. et al., 2016; UPTON et al., 2008). A ativação de CHOP altera o equilíbrio que existe entre as proteínas pró e anti-apoptóticas, sendo que, aumenta a expressão da proteína pró-apoptótica BIM e diminui a expressão de Bcl-2 (ZHANG et al., 2001). As proteínas da família das Bcl-2 e BH3 são componentes da maquinaria de morte celular programada e responsáveis por regular a apoptose celular, podendo ser subdivididas em proteínas pró-apoptóticas (BAK e BAX) e proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-xL). As proteínas pertencentes à família BH3 (domínio-homólogas 3), por sua vez, são proteínas pró-apoptóticas: BIM, PUMA e NOXA (LOPEZ; TAIT, 2015).

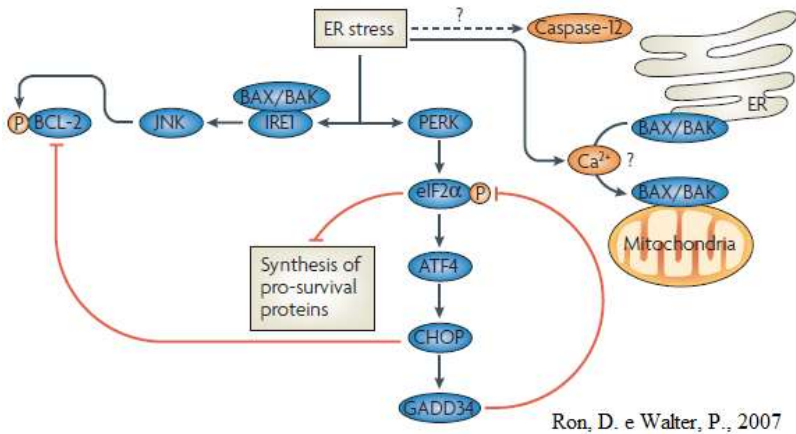


Figura 02. Indução de apoptose mediada pela ativação da via UPR. A via de morte celular induzida pelo estresse de RE ocorre de maneira ainda pouco compreendida. A indução de estresse, que pode ser causada pela liberação de cálcio, pode estar relacionado com a translocação dos fatores apoptóticos BAX/BAK do RE para a mitocôndria, bem como pela ativação de caspase-12 em resposta ao estresse de RE. A ativação de IRE1 que pode ser auxiliada pelo complexo pró-morte BAX/BAK, induz ativação da quinase N-terminal Jun (JNK) que contribui no processo de morte através da inativação da proteína anti-apoptótica BCL-2. PERK induz a fosforilação do fator eIF2 α que pode atuar inibindo a síntese de proteínas pró-sobrevivência e induz a tradução seletiva de ATF4, que consequentemente induz a transcrição do fator pró-apoptótico CHOP. CHOP pode atuar de duas maneiras: uma delas é na repressão da atividade e na expressão da molécula BCL-2 e a outra é na diminuição da transcrição de GADD34 que está envolvido na indução de apoptose.

Como consequência da redução na expressão de Bcl-2 induzida por CHOP, as proteínas pró-apoptóticas BAX (Bcl2 associada a proteína X) e BAK (homólogo de Bcl-2 antagonista de morte) sofrem oligomerização na membrana do RE e induzem a formação de poros que promovem o extravasamento de cálcio (MCCULLOUGH et al., 2001; ZONG et al., 2003). O lúmen do RE é o maior estoque intracelular de cálcio, sendo um importante promotor do dobramento proteico por estar relacionada com a chaperona calreticulina. O tráfego de cálcio para dentro e fora do RE regula diversas vias de sinalizações inclusive as vias em resposta ao estresse. Dessa forma, a liberação aguda de cálcio inibe diretamente o dobramento das proteínas e ainda desencadeia uma

sinalização que promovem a morte celular mediada pela mitocôndria (GALLUZZI et al., 2012; SANO; REED, 2013).

Além disso, a oligomerização dessas moléculas também forma um sítio ativo capaz de clivar e ativar a caspase-12 e assim desencadear a cascata proteolítica das caspases efetoras (MCCULLOUGH et al., 2001; NIEMI; MACKEIGAN, 2013; SCHRODER, 2006) O processo mitocondrial é semelhante ao do RE; no entanto, a proteína BAX citossólica sofre mudanças conformacionais que permitem seu ancoramento na membrana externa da mitocôndria onde se oligomeriza com BAK e ambas desestabilizam a membrana mitocondrial (CZABOTAR et al., 2014; NIEMI; MACKEIGAN, 2013). Existem outras duas moléculas pró-apoptóticas envolvidas nesse processo: BIM (mediador de morte de interação Bcl2), que é translocada para a membrana do RE e ativa caspase-12 e BIK (Bcl-2 interação de morte), que auxilia no processo apoptótico com o recrutamento de BAX e BAK para membrana do RE (MATHAI; GERMAIN; SHORE, 2005).

A oligomerização de BAX e BAK gera um evento de despolarização e aumento da permeabilidade da membrana externa da mitocôndria (MOMP). Alterações ocorridas no MOMP afetam o potencial de membrana, cessam a produção de ATP e permitem a formação de um complexo multi-protéico, conhecido como complexo do poro de transição dar permeabilidade (PTPC). A formação de PTPC permite a liberação de proteínas tóxicas para a célula que normalmente estão retidas dentro do espaço mitocondrial inter-membranas, como o citocromo c (CITc), o fator indutor de apoptose (IAF), endonucleases G (ENDOg), entre outras (GALLUZZI et al., 2012; LOPEZ; TAIT, 2015). As moléculas liberadas desempenham duas funções básicas no processo de apoptose: o CITc promove ativação da via intrínseca dependente de caspases, enquanto ENDOG e IAF ativam a via independente de caspase. Nesse contexto, o CITc ao ser liberado, liga-se à molécula adaptadora Apaf-1 e induz sua oligomerização em uma estrutura heptâmera, chamada de apoptosomo. O apoptosomo recruta e ativa pró caspase-9, que por consequência cliva e ativa das caspases efetoras -3 e -7. A atividade das caspases executoras efetivamente matam as células em minutos através da clivagem paralela de centenas de substratos diferentes. Simultaneamente, as proteínas ENDOG e IAF são enviadas para o núcleo onde mediam a fragmentação do DNA em larga escala (GALLUZZI et al., 2012; LI, J.; LEE; LEE, 2006; LOPEZ; TAIT, 2015).

Por ser um ponto sem volta na decisão de morte celular, MOMP é cuidadosamente regulado pelas proteínas anti-apoptóticas da família das Bcl-2. As proteínas Bcl-xL ligam-se a BIM inibindo sua translocação para a membrana do RE. Além disso, a proteína Bcl-2 atua através da interação com as proteínas BAK e BAX, diminuindo a capacidade de formarem dímeros e ligando-se às proteínas BH3 resultando na sua inativação (MATHAI et al., 2005; SCORRANO et al., 2003). Apesar das proteínas anti-apoptóticas finamente regularem a apoptose mediada pelas caspases, acredita-se que mecanismos de apoptose independentes de caspase podem ser ativados (ENDO e IAF) ou passivo (depleção de ATP) e tendem a prevalecer sobre a inibição das caspases, levando assim à morte celular (GALLUZZI et al., 2012).

Considerando o importante papel das caspases no processo de morte celular, a célula apresenta um extremo controle sobre as atividades dessas proteases. Dessa forma, caspases são produzidas e liberadas em formas inativas, que para desempenhar sua função precisa primeiramente ser clivada e tornar-se ativa. Nesse contexto, as caspases são divididas em iniciadoras e efetoras, sendo que, as iniciadoras atuam clivando as caspases efetoras, que de fato são as proteases que atuam diretamente na causa da morte celular (DICKENS et al., 2012; GROENENDYK; MICHALAK, 2005; LOPEZ; TAIT, 2015). A via intrínseca de apoptose envolve duas vias de ativação, uma dependente da mitocôndria e outra independente. A via dependente da mitocôndria tem a caspase-9 como caspase iniciadora central, que é ativada após a ligação do citocromo c na Apaf-1 para formar o apoptosoma, que irá ativar as caspases efetoras -3, -6 e -7 (FERRARO; CORVARO; CECCONI, 2003; SALVESEN; RENATUS, 2002). Em contrapartida, a via independente da mitocôndria é ativada em resposta ao prolongado estresse de RE, que tem a caspase-12 como a protease que inicia a cascata de ativação. A caspase-12 está localizada no citoplasma próxima ao RE, da mesma forma que outras caspases, apresenta-se em forma inativa e aparentemente é ativada apenas em resposta ao estresse no RE (NAKAGAWA et al., 2000).

1.4. Infecções virais e ativação da via UPR

Dentre os diversos fatores que podem alterar a homeostasia celular, gerando estresse no RE e ativando a via UPR, estão as infecções virais. Os vírus infectam as células e induzem a produção das proteínas virais, que são endereçadas ao RE e acabam aumentando a carga de proteínas a

serem dobradas no RE (KEPP et al., 2009). Em consequência ao aumento da síntese proteica e a sobrecarga do RE, as proteínas desdobradas são retidas e se acumulam no lúmen, levando à ativação da via UPR. Além do acúmulo de proteínas, o aumento da síntese proteica exige da maquinaria celular uma grande demanda energética com elevado consumo de ATP, gerando temporariamente um esgotamento de glicose no RE e dessa maneira potencializando a ativação da via UPR (COSTA et al., 2011). Para evitar que a ativação da via UPR prejudique ou impeça a formação de novas partículas virais, os vírus têm a capacidade de modular a ativação da via UPR através do controle de IRE1, PERK ou ATF6 (KEPP et al., 2009).

Diversos estudos têm elucidado os mecanismos pelos quais ao vírus podem modular a via UPR. O vírus Epstein-Baar (EBV) da família *Herpesviridae* por exemplo, é capaz de induzir dois mecanismos a fim de estimular a fase latente do ciclo de replicação: a via UPR e também a autofagia (GASS; GIFFORD; BREWER, 2002). O vírus da hepatite C (HCV), pertencente à família *Flaviviridae*, também interage com a via UPR, induzindo um acúmulo de duas glicoproteínas virais na membrana do RE e dessa forma ativando a via UPR (Chan & Egan, 2009). Conforme demonstrado recentemente em um estudo com pacientes portadores de hepatite C crônica, o HCV é capaz de induzir os três braços de sinalização da via UPR: ATF6, PERK e IRE1 (ASSELAH et al., 2010). Existem ainda vírus capazes de ativar determinados pontos da via UPR e simultaneamente inibir outros. Infecções *in vitro* do enterovírus 71 (EV71), pertencente à família *Enteroviridae*, em células de rhabdomyosarcoma levam ao aumento da expressão de BiP e induzem a fosforilação do fator eIF2 α . Além disso, EV71 inibe a tradução e ativação de ATF6, sugerindo que esse vírus é capaz de modular a via UPR (JHENG et al., 2010). O vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV), membro da família *Arenaviridae*, leva a uma indução seletiva da clivagem de ATF6, enquanto PERK e IRE1 não são ativados, demonstrando que os vírus podem modular os braços da via UPR de maneira alternada garantindo a replicação viral (PASQUAL et al., 2011). Por fim, o vírus do Oeste do Nilo (WNV), membro da família *Flaviviridae*, modula a ativação da via UPR através dos braços ATF6 e IRE1, levando ao aumento de XBP-1 pós-*splicing*. Porém, não há indícios da fosforilação de eIF2 α , sugerindo que a infecção por este vírus inibe a ativação de PERK e consequentemente o controle

traducional promovido pela via UPR (AMBROSE; MACKENZIE, 2011).

O vírus da imunodeficiência humana (HIV), gênero Lentivírus, família *Retroviridae*, é o responsável pela pandemia de AIDS no mundo (FAUCI, 1996; RAMBAUT et al., 2004). As primeiras evidências da possível relação entre o HIV e a via UPR surgiram com estudos da interação da proteína viral regulatória Tat (PUGLIESE et al., 2005). Essa molécula é capaz de promover a fosforilação e inibição do fator eIF2 α através de uma proteína com função semelhante a PERK, denominada proteína quinase dependente de RNA ou PKR. A inibição dessa fosforilação permite a continuação da tradução de novas proteínas no RE, aumentando o acúmulo em seu lúmen (MCMILLAN et al., 1995). Ademais, a infecção por HIV foi relacionada à indução na transcrição e tradução de ATF4, causando um acúmulo deste fator durante a fase aguda da infecção. ATF4 é também responsável por promover a reativação da replicação do HIV em células infectadas, sugerindo que eventos de estresse no RE que levam ao aumento de ATF4 podem ser relevantes para o fim do estado de latência viral (CASELLI et al., 2012). O HIV também é capaz de promover um aumento dos níveis de eIF2 α fosforilado em estágios precoces da infecção e durante picos de carga viral em macrófagos cultivados *in vitro* (CROSS et al., 2011). Estudos recentes sugerem que a infecção pelo HIV aumenta os níveis de expressão de BiP e leva a ativação dos três braços da via UPR, PERK, IRE1 e ATF6, em populações purificadas de linfócitos TCD4 e monócitos provenientes de pacientes submetidos ou não ao tratamento antirretroviral (DAHMER, 2014; (BORSA et al., 2015), sugerindo que o HIV é capaz de modular a via UPR com o objetivo de aumentar a replicação viral e assegurar o sucesso da infecção. Ademais, neste último artigo foi demonstrado que aparentemente o tratamento farmacológico apresenta um efeito sinérgico na ativação da via UPR, sugerindo que tanto o vírus quanto o tratamento antirretroviral atuam como ativadores da via UPR.

1.5. Efeitos da proteína Tat na patogênese da infecção pelo HIV

A infecção causada pelo HIV é caracterizada pela progressiva e gradual diminuição dos linfócitos TCD4, sendo esta a causa de uma profunda imunossupressão que caracteriza a fase avançada da infecção pelo HIV. A depleção de linfócitos TCD4 pode ser consequência da

citotoxicidade direta de linfócitos T CD8, formação de sincício, destruição celular no momento do brotamento viral, morte programada nas células infectadas ou morte induzida em células não infectadas, também conhecido como efeito *bystander*, que é desencadeado por proteínas virais solúveis ou por fatores imunes do hospedeiro (CUMMINS; BADLEY, 2010).

A proteína Tat do HIV é uma transativadora da transcrição de genes virais e ativadora da transcrição de genes celulares (JU et al., 2009; MAHLKNECHT et al., 2008; NEKHAI et al., 2007). É um importante fator de regulação nos estágios iniciais da infecção, sendo codificada por dois éxons (Figura 03) e apresenta tamanho que pode variar de 86 a 104 aminoácidos (PUGLIESE et al., 2005; SCHWARZE et al., 1999). A forma extracelular de Tat, que é liberada pelas células infectadas, também é capaz de entrar em outras células alvo e induzir alguns efeitos biológicos (FERRARI, A. et al., 2003; ZHENG et al., 2005). Algumas das funções propostas para a proteína Tat incluem remodelação da cromatina, fosforilação da RNA polimerase II envolvida na transcrição do genoma viral, transativação de genes virais e a ligação específica aos mRNA do HIV (SOBHIAN et al., 2010; TAHIROV et al., 2010). Sugere-se que todas essas funções aconteçam em forma de cascata com um objetivo central: expressão dos genes virais (ROMANI; ENGELBRECHT; GLASHOFF, 2010). Ela também atua na prevenção da interrupção prematura da transcrição dos pró-vírus através da ligação ao sítio 5' dos mRNAs virais nascentes, aumentando a produção de mRNA centenas de vezes (BELLINO et al., 2014; EMERMAN; MALIM, 1998). A expressão do genoma viral é regulada por porções do genoma como o intensificador e promotor que estão contidos na região LTR (do inglês, *Long Term repeat*) do HIV, localizada no terminal 5' do provírus integrado. Tat recruta a maquinaria celular responsável pela transcrição gênica para a região LTR viral, ligando-se assim ao promotor e induzindo a expressão dos genes virais (RICHTMAN et al., 2009; ROHR et al., 2003).

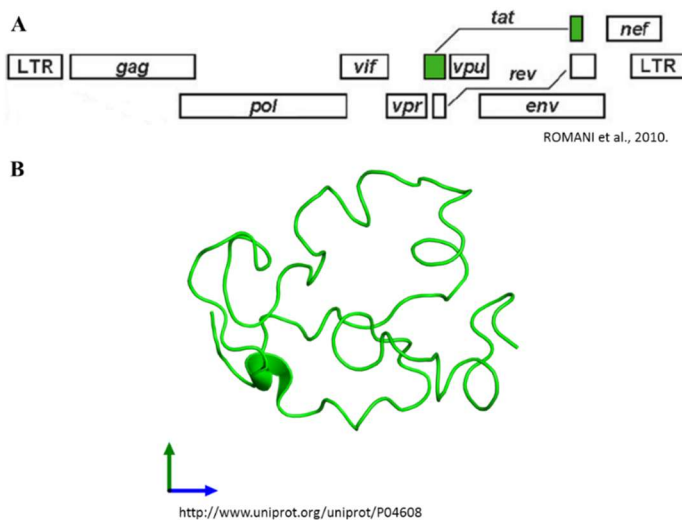


Figura 03. Estrutura gênica e conformacional da proteína Tat. (A) Esquema da organização dos genes virais que apresenta duas regiões LTR nos terminais 3' e 5' do genoma, entre eles estão os genes estruturais: gag, pol e env; genes acessórios: vif, vpr, vpu e nef; e genes regulatórios: tat e rev. (B) Possível conformação da estrutura tridimensional da proteína Tat do subtipo C do HIV, com base na sua composição aminoacídica.

Em células infectadas, Tat atua no aumento da expressão dos genes virais com o objetivo de induzir a formação de novas partículas virais, com conseqüente aumento da taxa de infecção das células vizinhas (BELLINO et al., 2014). Ao ativar a transcrição gênica das células, Tat aumenta a expressão de citocinas, do receptor CCR5 e o receptor de IL-2 (CD25) em células infectadas, além de inibir a expressão de complexo de moléculas de MHC classe I (LI, J. C. et al., 2005; STETTNER et al., 2009; ZHENG et al., 2005). Os efeitos transativadores não se limitam apenas as células infectadas, pois a proteína Tat é liberada pelas células com infecção produtiva e é capaz de entrar em células não infectadas através do efeito *bystander* conforme descrito na Figura 04 e exercer sua atividade diretamente em células responsivas (JU et al., 2009). Foi demonstrado que as proteínas Tat provenientes de diferentes subtipos virais exercem diferentes efeitos na modulação de expressão de citocinas. A expressão de moléculas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 é maior em células estimuladas com Tat-C quando comparado com Tat-B. Entretanto, proteína Tat subtipo B apresentou aumento na

expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF- α (GANDHI et al., 2009).

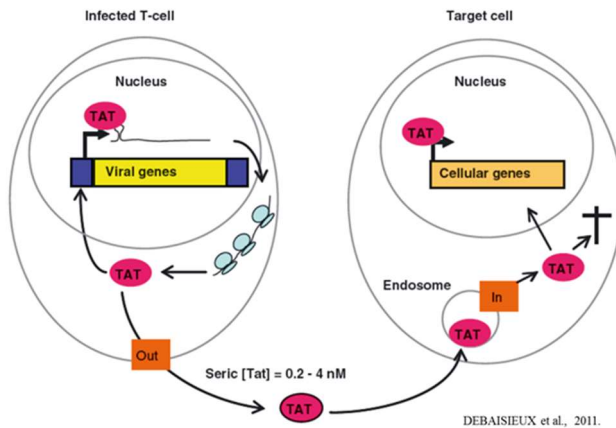


Figura 04. Atuação da proteína Tat nas células infectadas e em células-alvo através do efeito *bystander*. Em células infectadas a proteína Tat produzida no citoplasma pode seguir dois destinos: 1) atravessar a membrana nuclear e ligar-se na região LTR do genoma viral promovendo aumento na transcrição gênica ou ligar-se na região TAR do mRNA viral impedindo a formação de um *hairpin* e induzir aumento na tradução do mesmo; 2) a proteína Tat pode ser excretada das células infectadas, entrar em células-alvo vizinhas através de endocitose, e nessas células a proteína Tat também é direcionada ao núcleo e na ausência da região LTR viral, a proteína liga-se ao promotor de diversos genes celulares, promovendo aumento na transcrição dos mesmos.

A capacidade da proteína Tat de entrar em diferentes tipos celulares já tem sido demonstrado através de diversos estudos (FRANKEL; PABO, 1988; MANN; FRANKEL, 1991). Essa característica tem sido explorada como modelo de entrega de nano partículas para o interior da célula e do núcleo (VIVES, 2003). Tat é uma proteína promíscua que apresenta diferentes sítios de ligação na célula, tais como o receptor CD26 (dipeptidil aminopeptidase IV), LPR (receptor relacionado a lipoproteína), CXCR4 (receptor de quimiocina 4) e HSPGs (do inglês, *heparan sulphate proteoglycans*) (LIU et al., 2000; SIGNORET et al., 1997; TYAGI et al., 2001). A internalização de Tat nas células ocorre através de endocitose mediada por clatrina sendo posteriormente transportadas para o núcleo (BELLINO et al., 2014). As moléculas solúveis de Tat são secretadas por células infectadas mesmo na ausência

de lise celular, possivelmente por um mecanismo não convencional (ENSOLI et al., 1990). Ao ser secretada, a proteína Tat pode entrar em diversas células, bem como ser direcionada aos linfócitos T (LI, C. J. et al., 1995; WESTENDORP et al., 1995).

A proteína Tat pode estar implicada no declínio das células T CD4⁺, que é uma característica da AIDS (ZAULI; GIBELLINI, 1996), bem como no desenvolvimento da demência-associada ao HIV (GHAFOURI et al., 2006; GIRARD et al., 2011; ZAULI; GIBELLINI, 1996). A proteína Tat pode atuar sobre diversas vias biológicas em diferentes células não infectadas e mais recentemente, foi demonstrado que Tat induz apoptose em células HBMEC (do inglês, *human brain microvascular endothelial cells*) e associou-se essa morte celular com distúrbios neurológicos associados ao HIV (MA, R. et al., 2016). Estudos *in vitro* demonstraram que Tat é capaz de promover morte em diversos tipos celulares, através da ativação da via intrínseca de apoptose, culminando com a liberação de moléculas indutoras de apoptose, principalmente CITc seguido da ativação das caspases -3 e -9 (BELLINO et al., 2014; MA, R. et al., 2016). No entanto, o papel de Tat mediando apoptose de linfócitos TCD4 *in vivo* ainda não está esclarecido. Monócitos e macrófagos humanos tratados com Tat exógena apresentam aumento da expressão de TRAIL (ligante do fator de indução de apoptose), um ligante do fator de necrose tumoral TNF, que leva a ativação das caspase -3 e -8 nas células não infectadas, induzindo a apoptose pelo efeito *bystander*. Tat também tem sido relacionada com aumento de cálcio intracelular seguido da captação pela mitocôndria, o que resulta na geração de ROS que eventualmente podem ativar caspases. Sendo assim, tem sido sugerido que Tat tem habilidade de recrutar diversas proteínas pró-apoptóticas e induzir apoptose através de múltiplos mecanismos (ROMANI et al., 2010).

Neste contexto, o entendimento do mecanismo através do qual a proteína Tat modula a expressão gênica e induz estresse no RE, com consequente ativação da via UPR, pode revelar um novo mecanismo através do qual o HIV leva à diminuição do número de linfócitos T CD4⁺ circulantes. A identificação do papel de Tat no estresse no RE com posterior indução apoptótica podem reforçar a sugestão da via UPR como um possível alvo para terapia antirretroviral.

2 HIPÓTESE

A proteína Tat do HIV-1 é capaz de estimular células não infectadas pelo vírus através do efeito *bystander* e através da sua atividade transativadora induzir estresse celular e ativação da via UPR, que culmina na indução de apoptose em linfócitos.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

Investigar o envolvimento da proteína Tat do HIV-1 na indução de estresse no RE de células Jurkat com consequente ativação da via UPR e indução de apoptose através da via intrínseca.

3.2 Objetivos Específicos

- Padronizar as condições ideais de cultivo de células Jurkat E6-1;
- Verificar a ocorrência de apoptose nas células Jurkat estimuladas com a proteína Tat;
- Identificar possíveis alterações nas fases do ciclo celular e alterações nas células Jurkat estimuladas com a proteína Tat;
- Avaliar a despolarização e perda do potencial da membrana mitocondrial;
- Avaliar a ativação da caspases -12, -3 e -8;
- Identificar o estresse no RE através da expressão relativa de genes relacionados com a ativação da via UPR.
- Identificar a expressão relativa de genes relacionado à apoptose mediada pela via UPR.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento experimental

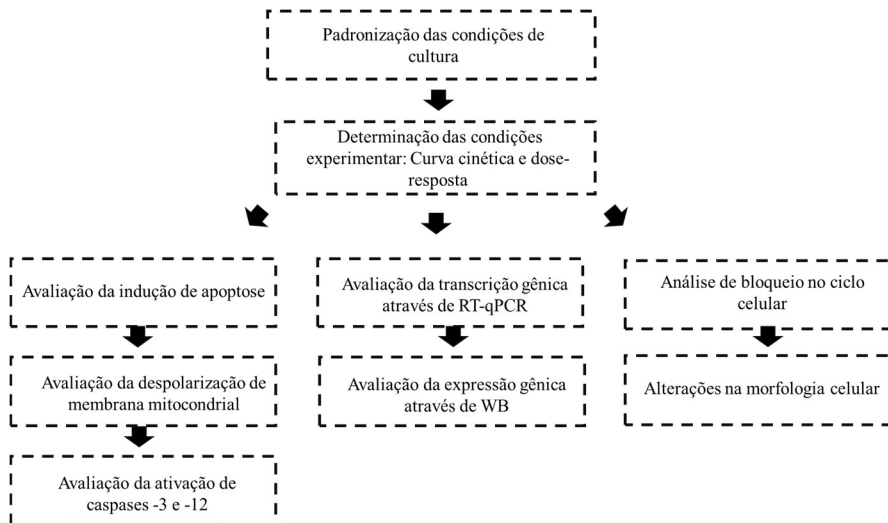


Figura 05. Fluxograma do delineamento experimental.

4.2 Cultura celular e padronização das condições experimentais

Células Jurkat E-61 (Banco de Células do Rio de Janeiro CR063, lote 04/07/06), comprovadamente livres de *Mycoplasma* através de ensaio específico de PCR. Jurkat é uma linhagem de linfócitos humanos, foram utilizados neste estudo e foram mantidas em garrafas de 25 cm², contendo 15 ml de meio RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal - SBF (Gibco®, Life Technologies), 2 mM de glutamina (Sigma®), 1 mM de Piruvato de Sódio (Sigma®), 10 mM de HEPES (Ácido 4- (2-hidroxi etil) -1-piperazina etano sulfônico), 2,0 g/L de Bicarbonato de sódio e 4,5 g/L de glicose e mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% CO₂. Para os ensaios de estimulação, foi utilizada a proteína recombinante Tat do HIV-1 subtipo C (Diatheva) livre de endotoxinas. A proteína Tat foi reconstituída em 1 ml de tampão fosfato (PBS), 0,1% de glicerol (Invitrogen, Life Technologies) e *Protease Inhibitor Cocktail 50x* (Promega) na concentração final de 5 µM, sendo então alíquotadas e armazenadas a -80°C.

Foi realizado um ensaio de cinética e dose-resposta para se determinar a dose ideal de Tat recombinante a ser utilizadas nos ensaios experimentais. Sendo assim, células Jurkat foram contadas em câmara de Neubauer utilizando azul de tripan (Sigma) 0,2% como indicador de viabilidade celular e 5×10^5 células foram transferidas para placas de 12 poços (TPP) contendo 2 ml do mesmo meio anteriormente descrito. Células Jurkat foram estimuladas com 50, 100 e 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 e 72 horas e foram utilizados como controles positivos um indutor de estresse celular e ativador da via UPR (Tunicamicina, Sigma®) e um inibidor da topoisomerase e indutor de apoptose (etoposídeo, Sigma®). Como controle negativo foram utilizadas células mantidas em cultura às quais se adicionou o meio no qual a proteína Tat foi reconstituída.

4.3 Determinação da taxa de apoptose

Após a estimulação das células Jurkat com Tat, a taxa de apoptose foi determinada utilizando o *kit Anexina V FITC Apoptosis Detection II* (BD, PharMingen Co.). O protocolo de marcação e aquisição das células foi previamente padronizado.

4.3.1 Marcação e aquisição celular

Para cada tratamento, a suspensão celular foi homogeneizada com micropipeta, 1 ml transferido para um microtubo de 1,5 ml e centrifugado a $350 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com tampão FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) (PBS suplementado com 2% SBF) à temperatura ambiente por duas vezes. O sobrenadante foi novamente desprezado e o centrifugado foi suspenso em 200 μ l de *Binding Buffer 1x* fornecido pelo kit.

Da suspensão celular, 50 μ l foram utilizados para a calibração e compensação do citometro e os 150 μ l restantes foram transferidos para os tubos de 5 ml para citometria (Falcon® BD) e procedeu-se a marcação. As células foram marcadas adicionando 5 μ l de Anexina V conjugada a isotiocianato de fluoresceína (FITC), homogeneizadas e em seguida os tubos foram envoltos em papel alumínio e incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após essa incubação, foram adicionados 5 μ l de iodeto de propídeo e 200 μ l de tampão FACS, sendo a suspensão celular homogeneizada em vórtex e em seguida 50.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo FACS Verse™ (BD

Biosciences). Posteriormente, os eventos adquiridos foram analisados utilizando o programa FlowJo™ (© Tree Star, Inc.) versão 10.0.

4.3.2 Determinação da estratégia de *gates*

A determinação das diferentes populações celulares foi realizada com o auxílio do gráfico de contorno 5%, sendo a separação dos *gates* determinada através do contorno de intersecção entre as populações. Uma vez determinados, os *gates* foram aplicados a todas as amostras e dessa forma as populações foram separadas e classificadas como viáveis, em processo de apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose. Foram consideradas como viáveis as células que se agruparam na população presente no quadrante inferior esquerdo do *gate* (FITC-, PI-), células em processo inicial de apoptose se agruparam no quadrante inferior direito (FITC+, PI-) enquanto a população de células em apoptose tardia se encontra no quadrante superior direito (FITC+, PI+) e as células em processo de necrose encontram-se no quadrante superior esquerdo (FITC-, PI+).

4.4 Análise da morfológica celular

Células Jurkat estimuladas com 200 nM da proteína Tat durante 72 horas foram recolhidas do poço e centrifugadas com PBS a 500 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o precipitado celular foi suspenso em 100 µl de PBS acrescido de DAPI (2-(4-amidino fenil)-1H -indole-6-carboxamida, Biolegend) a uma concentração final de 300 nM, incubado durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Para visualização no microscópio, 10 µl da suspensão celular foram aplicados em lâminas de vidro e coberta com laminulas, sendo as células visualizadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX40) utilizando filtro de luz (comprimento de onda) e objetiva de aumento 100 x.

4.5 Avaliação da permeabilidade e integridade da membrana mitocondrial

A integridade da membrana mitocondrial das células Jurkat estimuladas com a proteína Tat foi realizado através da análise de despolarização de membrana mitocondrial. Para esse ensaio foi utilizado

a sonda *MitoView*TM *Blue* (Biotium) seguindo as instruções do fabricante. Primeiramente, 10 µl da sonda foi diluído em 10 ml de PBS e armazenado em frasco âmbar na geladeira a 4°C. As células foram estimuladas como previamente descrito com 200 nM de proteína Tat por 72 horas, sendo então coletadas e centrifugadas a 1000 x g; o precipitado foi suspenso em 200 µl da solução *MitoView* e incubadas em gelo durante 30 minutos. Após a incubação, 50.000 eventos foram adquiridos utilizando o citômetro de fluxo FASC Canto II (BD Bioscience) e posteriormente os resultados foram analisados utilizando o programa FlowJoTM (© Tree Star, Inc.) versão 10.0.

4.6 Avaliação da atividade de caspases

4.6.1 Avaliação da atividade da Caspase-3

Células Jurkat foram estimuladas durante 72 horas com 200 nM da proteína Tat, de acordo com as condições previamente padronizadas. Após o período de estímulo, as células foram lisadas por sonicação. Em uma placa de 96 poços (BD Bioscience) 25 µl do lisado foram adicionados a 75 µl do meio de reação contendo HEPES 25 mM (pH 7,4), CHAPS 1%, EDTA 1 mM, sacarose 10% e DTT 3 mM. A esta mistura foram adicionados 10 M do substrato fluorogênico para caspase-3 acetil-Asp-Glu-Val-Asp-amino metil cumarina (Ac-DEVD-AMC) (Sigma®) e incubado por 2 horas a 37°C. A atividade da caspase-3 foi avaliada através da produção do AMC fluorescente monitorada em espectrofotômetro SpectraMax® M2° (Molecular Devices), utilizando o comprimento de onda de 380 nm para excitação e emissão em 465nm. Os valores obtidos nas amostras foram subtraídos da fluorescência dos brancos correspondentes sem lisado celular. Os resultados foram expressos comparando o aumento dos níveis de fluorescência com o controle.

4.6.2 Avaliação da atividade da Caspase-8

Células Jurkat foram estimuladas durante 72 horas com 200 nM da proteína Tat, de acordo com as condições previamente padronizadas. Após o período de estímulo, as células foram lisadas por sonicação. Em uma placa de 96 poços (BD Bioscience) 25 µl do lisado foram adicionados a 75 µl do meio de reação contendo HEPES 25 mM (pH 7,4), CHAPS 1%, EDTA 1 mM, sacarose 10% e DTT 3 mM. A esta

mistura foram adicionados 10 M do substrato fluorogênico para caspase-8 acetil-Ile-Glu-Trip-Asp-7-amino-4-metil cumarina (Ac-IETD-AMC) (Sigma®) e incubado por 2 horas a 37°C. A atividade da caspase-3 foi avaliada através da produção do AMC fluorescente monitorada em espectrofotômetro SpectraMax® M2^e (Molecular Devices), utilizando o comprimento de onda de 380 nm para excitação e emissão em 465nm. Os valores obtidos nas amostras foram subtraídos da fluorescência dos brancos correspondentes sem lisado celular. Os resultados foram expressos comparando o aumento dos níveis de fluorescência com o controle.

4.6.3 Avaliação da atividade da caspase-12

A avaliação da atividade da caspase-12 foi realizada utilizando o *kit Caspase-12 Fluorometric Assay* (BioVision, Inc). Células Jurkat foram estimuladas durante 72 horas com 200 nM da proteína Tat, de acordo com as condições previamente padronizadas. Após o período de incubação, 3×10^6 células foram transferidas para placas de 96 poços (BD Biosciense), centrifugadas a $2000 \times g$ por 5 minutos e ao precipitado celular foram adicionados 50 µl do *Cell Lysis Buffer* gelado e mantido em gelo por 10 minutos. Ao *2x Reaction Buffer* foram adicionados 10 mM de DTT e dessa mistura, 50 µl foi adicionado a cada poço. Em seguida, foram adicionados 5 µl da solução 1 mM do substrato 7-Amino-4-Trifluoro Metil cumarina (ATAD-AFC) e incubado a 37°C por 2 horas. A atividade da caspase-12 foi avaliada através da produção do AFC fluorescente monitorada em espectrofotômetro SpectraMax® M2^e (Molecular Devices), utilizando o comprimento de onda de 400nm para excitação e emissão em 505nm. Os valores obtidos nas amostras foram subtraídos da fluorescência dos brancos correspondentes sem lisado celular. Os resultados foram expressos comparando o aumento dos níveis de fluorescência com o controle.

4.7 Avaliação dos níveis de transcritos gênicos

4.7.1 Extração e purificação do RNA total

Previamente ao processamento das amostras, todos os materiais utilizados para a extração foram devidamente higienizados com a solução *RNase Away*® (Invitrogen™, Applied Biosystems). Após a

estimulação celular com a proteína Tat, 1 ml da suspensão de células foi transferida da placa para um microtubo de 1,5 ml *DNase/RNase free* (Axygen®), sendo as células centrifugadas a 2.000 x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado lavado com PBS e seguiu para a etapa de extração do RNA seguindo as indicações do *PureLink® RNA Mini Kit* (Ambion®, Life Technologies). Ao precipitado celular, foram adicionados 300 µl do *Lysis Buffer* contendo 1% de 2-mercaptoetanol (Sigma®), sendo o precipitado homogeneizado com micropipeta e em seguida centrifugado a 12.000 x g por 2 minutos a 4°C. Ao tubo contendo o lisado celular, foram adicionados 300 µl de etanol 70% (Invitrogen™, Applied Biosystems), sendo o lisado homogeneizado com a micropipeta até obter uma solução homogênea. Os 600 µl totais do lisado foram transferidos para a coluna de purificação e centrifugado a 12.000 x g por 15 segundos à temperatura ambiente. A coluna primeiramente foi lavada com 700 µl do *wash buffer 1* através da centrifugação a 12.000 x g por 15 segundos, sendo posteriormente realizadas duas etapas com o *wash buffer 2*, acrescido de etanol 96% (Invitrogen™, Applied Biosystems) através da centrifugação a 12.000 x g por 15 segundos. Ao fim das etapas de lavagem a coluna foi centrifugada a 12.000 x g por 2 minutos para secar a coluna e evitar a contaminação com proteínas celulares. A eluição do RNA total foi realizada através da adição de 50 µl de água *RNase-free* à coluna incubação por 1 minuto seguida da centrifugação a 12.000 x g por 2 minutos à temperatura ambiente. Após a purificação o RNA foi mantido em gelo e imediatamente procedeu-se com o tratamento com DNase.

4.7.2 Tratamento com DNase

Para garantir que as amostras de RNA estavam livres da contaminação com DNA genômico, as amostras foram tratadas com a enzima DNase através do *kit DNase I Amplification Grade* (Invitrogen™, Applied Biosystems) seguindo o protocolo do fabricante. Imediatamente após a extração, foram adicionados 5 µl de 10x *DNase I reaction buffer*, 1 µl de *DNase I Amp Grade* 1U/µl às amostras de RNA. As amostras foram mantidas por 15 minutos à temperatura ambiente e seguiu-se com a adição de 5 µl da solução de EDTA 25 mM e incubadas a 65°C por 10 minutos a fim de inativar a enzima DNase e então as amostras foram armazenadas a -80°C.

4.7.3 Quantificação do RNA total e síntese do DNA complementar (cDNA)

Para realizar a etapa de síntese da fita de DNA complementar (cDNA), as amostras foram quantificadas através da leitura de absorbância a 260nm em espectrofotômetro (Picodrop), utilizando-se de água *DNase/RNase free* utilizada para a eluição do RNA após a purificação para zerar o aparelho. Para a determinação da concentração de RNA foram utilizados 2,5 µl da amostra e a pureza das amostras foi avaliada através da análise da razão 260/280.

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o *Kit SuperScript III First-Strand* (Invitrogen™, Applied Biosystems). As amostras foram processadas simultaneamente e as reações foram realizadas a partir da concentração fixa de 500 ng de RNA total. Para isso, o volume de RNA total correspondente a 500 ng totais de cada amostra foi transferido para um microtubo *DNase/RNase free* de 0,2 ml (Axygen®) e adicionou-se 1 µl de *oligodT* 1 µl de *Annealing buffer* e completou-se com água *DNase/RNase free* para obter-se um volume final de 8 µl. As amostras foram incubadas no termociclador (Mastercycler® Gradient, Eppendorf) a 65°C por 5 minutos e em seguida transferidas para o gelo por 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados 10 µl de *2x first-strand reaction mix* e 2 µl de *SuperScript III/RNaseOUT enzyme mix*, totalizando 20 µl de volume final. As amostras foram novamente incubadas no termociclador por 10 minutos a 25°C, seguido de um ciclo único de 50 minutos a 50°C. A reação foi encerrada através da inativação por aquecimento da enzima transcriptase reversa pela incubação a 85°C durante 5 minutos. Ao cDNA sintetizados foram adicionados 30 µl de água *DNase/RNase free* (Invitrogen™, Applied Biosystem), sendo então as amostras alíquotadas e armazenadas a -20°C. Como controle negativo da reação, foi realizada uma reação conforme descrito acima, porém, sem RNA.

4.7.4 Escolha dos iniciadores

Para a análise dos níveis de transcrição gênica das moléculas *ATF6*, *PERK*, *IRE1*, *EIF2 α* , *BIP*, *ATF4*, *XBP-1u*, *XBPI-s*, *CHOP*, *GADD34*, *BIM*, *BCL2* foi utilizado o método de Cq Comparativo. Para realizar uma quantificação da expressão gênica com acurácia foram utilizados 4 genes de referência como normalizadores da análise (*B2M*, *RPL13A* e *TBP*), sendo que o principal critério de escolha foi a alta estabilidade desses genes em leucócitos, principalmente em linfócitos (VANDESOMPELE et al., 2002).

As seqüências dos iniciadores para os genes *IRE1* (FU, 2014), *PUMA* (ZHU, 2013), *GADD34* (SUNDARAM, 2010), *BCL-2* (JI, 2015), *XBP-1u* e *XBP-1s* (LENIN et al., 2015) são oriundas da literatura, enquanto para os genes *ATF6*, *PERK*, *CHOP*, *EIF2 α* , *NOXA* e *BIM* foram desenhados utilizando o programa *BioEdit*® (Ibis Biosciences) e avaliados através da ferramenta *Primer-BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) disponível no *GenBank* e as análises de formação de dímeros e grampos foi realizada através da ferramenta *OligoAnalyser 3.1* (<https://www.idtdna.com/calc/analyser>). Os iniciadores foram desenhados de forma que produzissem produtos de até 250 pb e que estivessem entre dois éxons diferentes. Todos os iniciadores, senso (Fw) e antissenso (Rv) estão listados no Quadro 01. Os iniciadores dos genes de interesse foram sintetizados pela empresa GenOne® e diluídos em água *DNase/RNase free* (Invitrogen™, Applied Biosystems) a uma solução estoque de 100 mM e armazenados a -20°C.

Para selecionar os genes de referência que apresentavam maior estabilidade em células Jurkat, foi utilizada a ferramenta on-line *RefFinder* (<http://www.leonxie.com/referencegene.php>), que permite a análise da estabilidade dos diferentes genes e sugere a melhor combinação dentre os genes de referência para aquele tipo celular (ANDERSEN; JENSEN; ORNTOFT, 2004; PFAFFL et al., 2004; VANDESOMPELE et al., 2002).

4.7.5 Análise da eficiência e especificidade dos iniciadores

As análises da eficiência das reações e a especificidade dos iniciadores, tanto dos genes de interesse quanto dos genes de referência, foram realizadas através de curvas padrões, construídas a partir de um *pool* de RNA proveniente das amostras estimuladas e não estimuladas. A análise da curva de dissociação, foi utilizada para se verificar a especificidade dos iniciadores, através da presença de um pico único na reação.

A verificação da eficiência das reações foi calculada através do valor de inclinação da reta, também conhecido como *slope*, obtido nas reações através da fórmula:

$$\text{Eficiência} = 10^{-1/\text{slope} - 1}.$$

Quando os iniciadores apresentaram eficiências dentro do intervalo entre 95 a 105%, foram considerados comparáveis, sendo assim, foi possível realizar o método do Cq comparativo para determinar os níveis de expressão dos genes de interesse em relação aos genes de referência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Quadro 01. Características dos iniciadores utilizados para análise de expressão relativa dos genes de interesse.

Gene interesse	ID	Sequências (5' → 3')		Éxons	Produto (pb)	Referência
PERK	4836.6	Fw	AAAGTCCACCTTCCCCAAC	1	116	(Produzida para a realização deste trabalho)
		Rv	CAGCCTATCTCGGACATCG	1		
ATF6	7348.3	Fw	ATTCAGACAGTACCAACGC	6	235	(Produzida para a realização deste trabalho)
		Rv	TCACTGGGCTATTGCTG	7		
IRE1	1433.3	Fw	GACAGGCTCAATCAAATGG	2	245	(FU et al., 2015)
		Rv	CGGTCAGGAGGTCAATAACA	6		
EIF2 α	4094.4	Fw	GTGGAAGATGTAGTGATGGTG	1	170	(Produzida para a realização deste trabalho)
		Rv	ACCACACACTCATTCTGCC	2		
XBP-1s	22.11	Fw	TGCTGAGTCCGCAGCAGGTG	4	221	(LENIN et al., 2015)
		Rv	GCTGGCAGGCTCTGGGGAAG	6		
XBP-1u	22.11	Fw	TGGATTCTGGCGGTATTGAC	5	245	

		Rv	TCCTTCTGGGTAGACCTCTG	6		
BIP	21629 2.1	Fw	CGGGCAAAGATGTCAGGAAAG	2	211	(HIRAMATSU; JOSEPH; LIN, 2011)
		Rv	TTCTGGACGGGCTTCATAGTAGA	3		
ATF4	73754. 1	Fw	TCAAACCTCATGGG-TTCTCC	1	235	(INAGEDA, 2010)
		Rv	GTGTCATCCAACGTGGTCAG	2		
CHOP	11950 57.1	Fw	GTCATTGCCTTTCTCCTTCGG	3	296	(Produzida para a realização deste trabalho)
		Rv	TGGTTCTCCCTTGGTCTTCC	4		
GADD34	14330. 3	Fw	GTGGAAGCAGTAAAAGGAGCAG	2	370	(GANAPATHY-KANNIAPPAN et al., 2010)
		Rv	CAGCAACTCCCTCTTCCTCG	2		
BIM	12041 06.1	Fw	CCTTGTTCCCCCAAATGTC	1	107	(Produzida para a realização deste trabalho)
		Rv	TCTCGGTCACACTCAGAAC	2		
BCL-2	657.2	Fw	CTGCACCTGACGCCCTTCACC	2	119	(JI et al., 2015)
		Rv	CACATGACCCACCGAACTCAAAGA	2		

Quadro 02. Características dos iniciadores utilizados para análise de expressão relativa dos genes de referência

Gene interesse	ID	Sequências (5' → 3')		Exons	Produto (pb)	Referência
B2M	567	Fw	ATGAGTATGCCTGCCGTGTGA	2	101	(ASIOLI et al., 2011)
		Rv	GGCATCTTCAAACCTCCATG	3		
TBP	6908	Fw	GCCTCCCCACCCCCTTCTTT	8	106	(STEINAU; RAJEEVAN; UNGER, 2006)
		Rv	GCCACACCCTGCAACTCAACATCC	8		
UBC	7316	Fw	ATTTGGGTGCGAGTTCTTG	1	123	(MOUS et al., 2012)
		Rv	TGCCTTGACATTCTCGATGGT	2		

4.7.6 Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

A análise dos níveis de transcrição gênica foi realizada através da técnica de RT-qPCR (transcrição reversa seguida de PCR quantitativa em tempo real) utilizando o *kit FastSYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems™). A reação foi realizada no termociclador *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems™) utilizando placas de 96 poços *MicroAmp® Optical* (Applied Biosystems™). As reações foram otimizadas para serem realizadas em um volume final de 10 µl por poço, sendo assim, foram adicionados 8 µl do mix, seguido da adição de 2 µl de cDNA diluído 1:5. O mix foi preparado com 5 µl de *FastSYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems™), 0,5 µl de cada iniciador (senso e antissenso), ambos na concentração final de (0,4 pmol) e 2 µl de água *DNase/RNase free* (Invitrogen™, Applied Biosystems) por poço. A placa foi selada com *MicroAmp® Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems™) e em seguida centrifugada a 2000 x g por 3 minutos a 4°C. As reações de amplificação ocorreram nas seguintes condições: 95°C por 10 segundos para ativação da enzima, seguida de 50 ciclos de 95°C por 15 segundos para desnaturação das fitas de cDNA e 45 segundos nas temperaturas de anelamento específica para a hibridização de cada par de iniciadores e extensão das seqüências.

O nível de fluorescência foi lido ao final de cada ciclo, sendo que, após 50 ciclos foi realizada a curva de dissociação através da leitura dos níveis de fluorescência a cada 3 segundos durante o aumento de 0,5°C até ser atingida a temperatura de 95°C. A análise da curva de dissociação foi utilizada para verificar a qualidade da amplificação e analisar o perfil dos produtos formados. Ao final os resultados foram analisados através do *StepOnePlus™ Software v.2.3* (Applied Biosystems™);

4.8 Análise do bloqueio do ciclo celular

Com o objetivo de determinar se células Jurkat expostas à proteína Tat sofreram bloqueio em alguma fase do ciclo celular, células Jurkat foram estimuladas com 200 nM da proteína durante 72 horas. Após o período de estímulo, 5×10^5 células foram coletadas, e centrifugadas com

PBS 350 x g por 5 minutos à temperatura ambiente, para garantir a retirada de todo o meio de cultura. Para fixar as células, ao precipitado celular foram adicionados 200 µl de etanol 70% (Sigma) e a suspensão celular foi incubada a 4°C durante 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 1 ml de tampão FACS e centrifugadas a 350 x g por 5 minutos à temperatura ambiente e para a marcação das células, ao precipitado foram adicionados 200 µl tampão FACS e 10 µl de PI, a suspensão foi incubada no escuro durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, 10.000 eventos foram adquiridos utilizando o citômetro de fluxo FASC Canto II (BD Bioscience) e posteriormente os resultados foram analisados utilizando o programa FlowJo™ (© Tree Star, Inc.) versão 10.0.

4.9 Análise estatística

As análises estatísticas e a construção dos gráficos foram realizadas no programa *GraphPad Prims* v. 6. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados apresentavam uma distribuição paramétrica. Uma vez observada a distribuição paramétrica, a comparação de duas variáveis foi realizada através do teste t de *Student* não-pareado. A comparação de mais de duas variáveis foi realizada pelos testes de análise de variância (ANOVA) e do teste de Sidak para correção das comparações múltiplas. Foi adotado um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Curva dose-resposta e cinética do estímulo com a proteína Tat do HIV-1

A hipótese central deste trabalho é a capacidade da proteína Tat, ser internalizada e gerar um estresse capaz de induzir apoptose em células Jurkat. Para testar tal hipótese, primeiramente se fez necessário a construção de uma curva dose-resposta, com o objetivo de determinar se há indução de apoptose, se esse fenômeno é tempo e dose dependente e escolher a melhor condição experimental onde haveria a maior taxa de morte celular. Para o primeiro resultado da curva dose-resposta, as células foram estimuladas com diferentes concentrações da proteína Tat em diferentes tempos, nas condições ideias padronizadas anteriormente. Após o período de incubação primeiramente as células foram recolhidas do poço e uma alíquota foi utilizada para a técnica de contagem manual em câmara de Neubauer e o corante de viabilidade celular azul de tripan.

O resultado da contagem total de células conforme demonstrado na Figura 06, indica que nas primeiras 24 horas aparentemente a incubação das células com diferentes concentrações de Tat não induziu nenhuma alteração na proliferação celular a ponto de gerar diferença estatística entre os grupos. Após 48 horas de incubação foi possível observar que as células que foram incubadas com a maior concentração de Tat (200 nM) já apresentam diminuição no número total de células, quando comparado com o grupo controle. No entanto, essa diferença se torna mais acentuada após 72 horas de estímulo, onde foi possível observar que a proteína Tat foi capaz de diminuir o número total de células até em concentrações menores. O estímulo com 200 nM foi capaz de induzir uma redução de 44,4% no número de células quando comparado ao controle.

Determinação do número de células Jurkat estimuladas com a proteína Tat

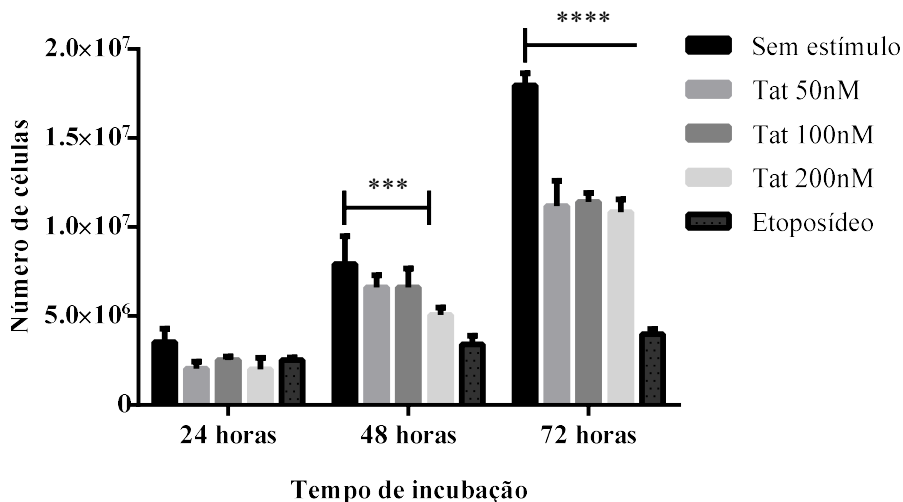


Figura 06. Determinação do número de células Jurkat estimuladas com a proteína Tat. Distribuição do número total de células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle negativo e células estimuladas com 1 μ M de etoposídeo representam o controle positivo. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (***) representa $p < 0,001$ e (****) $p < 0,0001$.

Da suspensão celular, 1 ml foi retirado de cada poço para a análise de indução de apoptose por citometria de fluxo através da marcação com Anexina V – FITC e PI. As células foram processadas conforme descrito anteriormente e 50.000 eventos foram adquiridos no citômetro. A determinação dos *gates* e análise dos estágios de morte celular foram realizados conforme descrito na Figura 07.

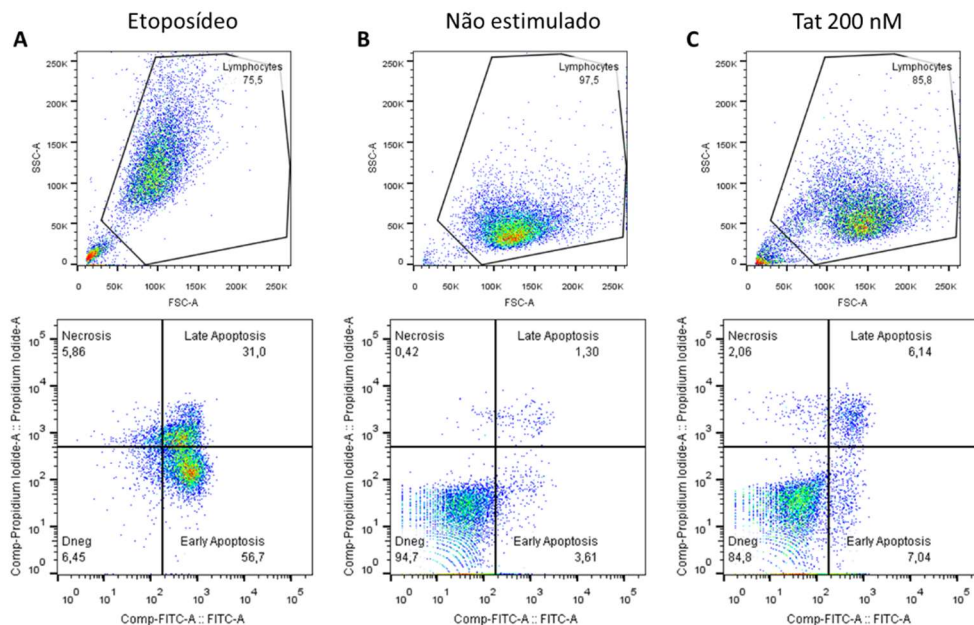


Figura 07. Determinação dos gates para análise de apoptose em células Jurkat. Análise de apoptose em células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat, realizada com base nos gates demonstrando a frequência dos eventos em *Dneg* indicando células viáveis, *Early apoptosis* células em estágio inicial de apoptose, *Late apoptosis* células em estágio tardio de apoptose e *Necrosis* células em processo de necrose. (A) Células Jurkat tratadas com Etoposídeo, demonstrando o controle positivo de apoptose; (B) células Jurkat sem estímulo representando o controle negativo; (C) células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas.

Os resultados obtidos representados na Figura 08 demonstram a soma das porcentagens de células em processo de apoptose inicial e tardio que foram estimuladas com a proteína Tat. O ensaio de curva dose-resposta não foi realizado em triplicata, pois o objetivo era escolher a melhor condição experimental. Sem as análises estatísticas não foi possível realizar nenhuma correlação muito confiável; no entanto, nota-se que aparentemente tanto a dose de proteína quanto o tempo de incubação são fatores importantes na indução de apoptose.

Curva dose-resposta e cinética de células Jurkat estimuladas com a proteína Tat

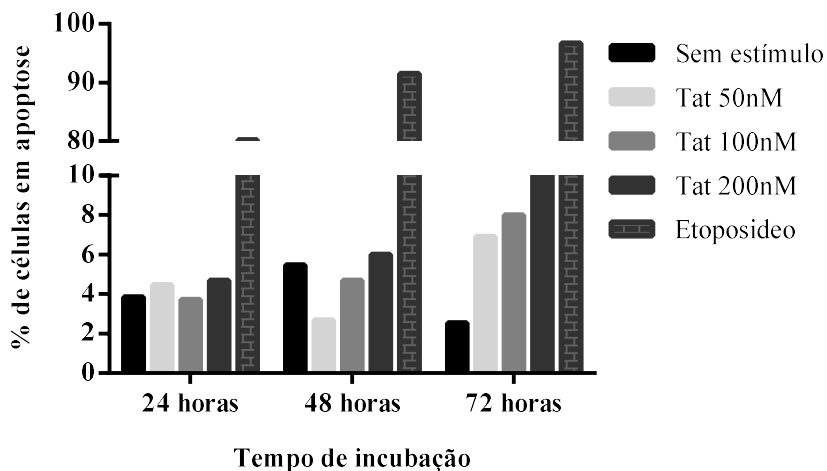


Figura 08. Curva dose-resposta e cinética de células Jurkat estimuladas com a proteína Tat. Avaliação da porcentagem de células Jurkat em processo de apoptose estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. O controle negativo representado por células sem estímulo e células estimuladas com 1 μ M de etoposídeo representam o controle positivo.

Observa-se que durante 72 horas de estímulo, as concentrações de proteína apresentaram indução de apoptose, sendo que, a taxa de morte observada com 50 nM foi 6,9%, com 100 nM 7,98% e com 200 nM foi de 11,99%. Dessa forma, é possível observar que aparentemente a indução de apoptose nas células estimuladas é tanto dose quanto tempo-dependente e determinou-se que a melhor condição experimental seria com a concentração de 200nM. Sendo assim, os próximos experimentos foram realizados em triplicata nessa concentração de Tat.

5.2 Análise da indução de apoptose em células estimuladas com proteína Tat

Uma vez determinada a melhor condição experimental, as células Jurkat foram estimuladas com 200 nM de proteína Tat, incubadas durante 24, 48 ou 72 horas e foram igualmente analisadas por citometria de fluxo através da marcação celular com Anexina V- FITC e PI (Figura 09). Embora os dois primeiros pontos experimentais (24 e 48 horas) não tenham apresentado diferenças significativas na proporção de células em processo de apoptose, com 72 horas de estímulo foi possível observar uma significativa indução de apoptose nas células estimuladas com Tat quando comparadas com o controle. Concluiu-se o segundo objetivo deste trabalho: 200 nM (4 µg/ml) da proteína Tat é capaz de induzir apoptose em células Jurkat durante 72 horas de estímulo. Assim sendo, os próximos experimentos realizados utilizaram apenas este ponto experimental para análise.

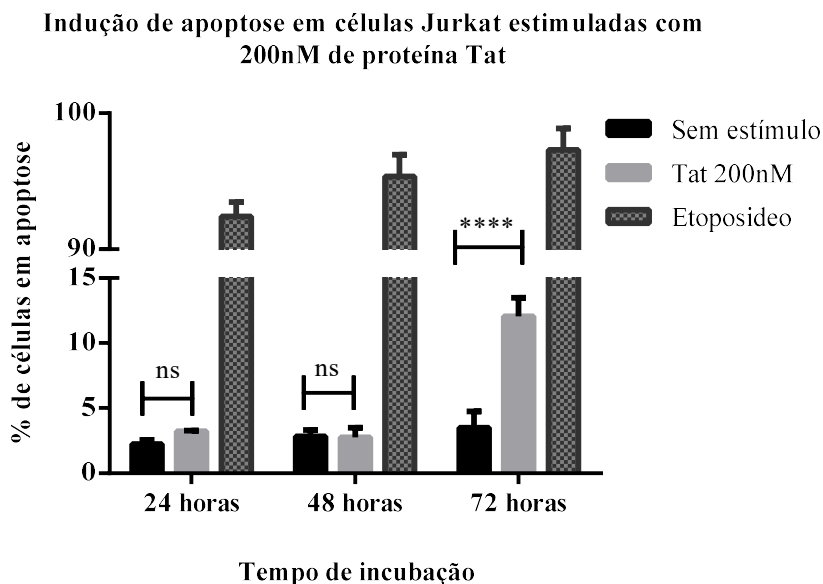


Figura 09. Indução de apoptose em células Jurkat estimuladas com 200nM de proteína Tat. Avaliação da porcentagem de células Jurkat em processo de apoptose estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas de estímulo. O controle negativo representado por células sem estímulo e células estimuladas com 1µM de etoposídeo representam o controle positivo. A

diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$ e ns é não significativo.

5.3 Análise da morfologia celular

A técnica de citometria de fluxo, além de fornecer informações sobre a taxa e os estágios de apoptose também indica a área e o tamanho das células (FSC-A) e a granulosidade e complexidade intracelular (SSC-A) da população analisada. Com base nesses dois parâmetros, foi possível identificar a mediana da população analisada, ou seja, identificar qual é o tamanho e complexidade média das células que compõe uma dada população. Na Figura 10, observou-se que as células estimuladas com a proteína Tat (B) possuem uma população mais dispersa, indicando maior diversidade de tamanho e granulosidade quando comparada com o controle não estimulado (A).

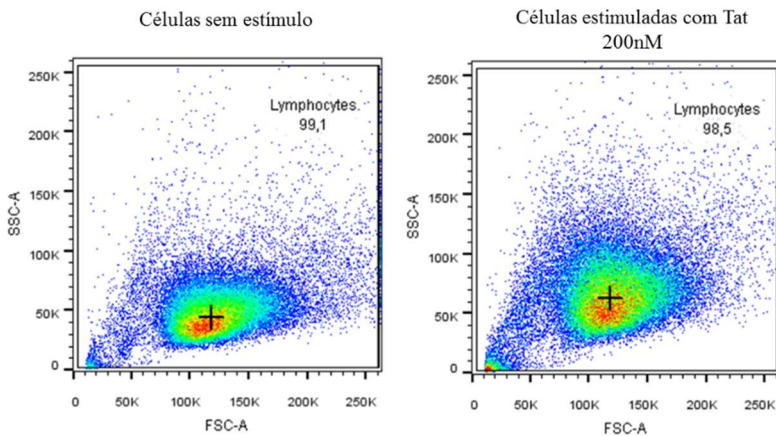


Figura 10. Determinação da distribuição média da população de células Jurkat. Análise de distribuição realizada com base no *dotplot* demonstrando alterações nas distribuições e nas medianas dos eventos em função do tamanho (FSC-A) e a complexidade intracelular (SSC-A) de células Jurkat sem estímulo e células estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas.

Partindo do pressuposto que o estímulo com a proteína Tat gera uma diferença no perfil celular, foram selecionados aproximadamente 99% dos eventos adquiridos e calculou-se a mediana da área (FSC-A) e da complexidade das células (SSC-A). A análise de mediana entre FSC

e SSC permitem encontrar o centro de distribuição das células no gráfico e dessa forma identificar se houve deslocamento das populações. Observou-se que células estimuladas com 200 nM da proteína Tat por 72 horas tiveram um aumento tanto de tamanho em área quanto de complexidades intracelulares (Figura 11).

Análise da variação de tamanho e complexidade em células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat.

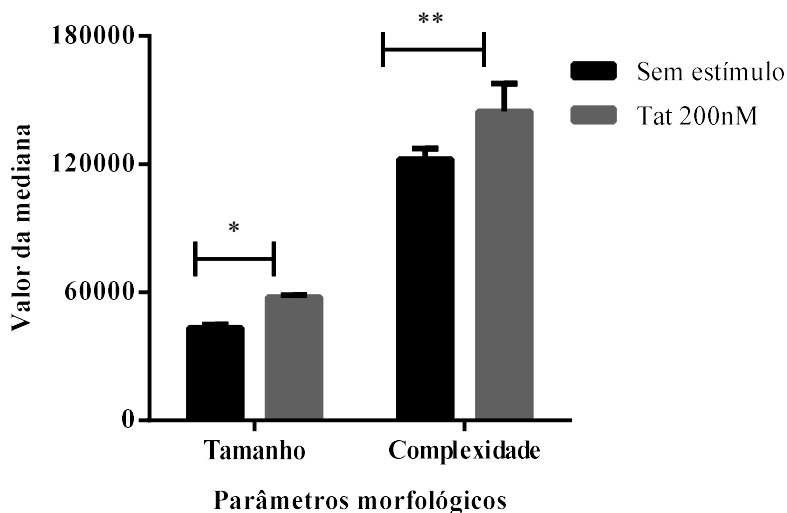


Figura 11. Análise da variação de tamanho e complexidade em células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat. Alterações nas medianas de distribuição dos eventos em função do tamanho e a complexidade intracelular de células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas. O controle negativo representado por células sem estímulo. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (*) $p < 0,01$ e (**) $p < 0,0017$.

Para uma análise complementar dos dados apresentados anteriormente, células Jurkat foram estimuladas com a proteína Tat durante 72 horas e em seguida aproximadamente 10^3 células foram permeabilizadas e incubadas com DAPI 300 nM e incubadas por 15 minutos. Após a incubação, as células foram analisadas no microscópio de fluorescência utilizando a objetiva de aumento 100x (Figura 12). Observou-se que células estimuladas com a proteína Tat em processo de morte celular formaram corpos apoptóticos. Além disso, observou-se

que algumas células não apresentavam as membranas celulares bem delimitadas, bem como apresentavam tamanho anormal, de maneira idêntica à observada na citometria de fluxo. Em contrapartida nas células controle não estimuladas (A) foram observadas membranas bem definidas e inclusive, algumas estavam em processo de replicação.

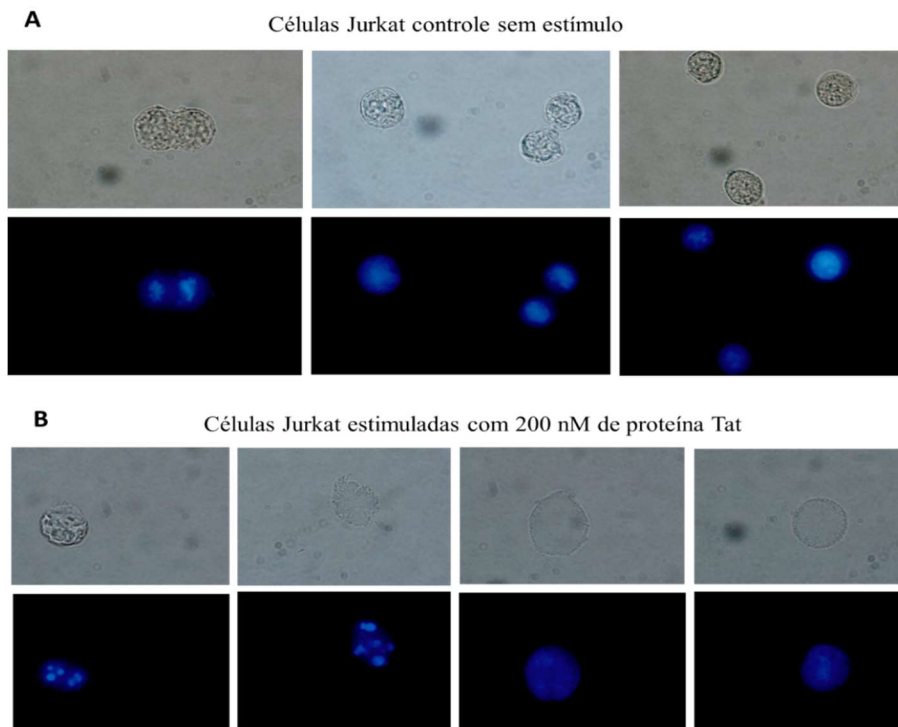


Figura 12. Avaliação morfológica por microscopia de fluorescência de células Jurkat estimuladas com a proteína Tat. (A) Células Jurkat sem estímulo, consideradas como controle negativo; **(B)** Células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas. As células foram marcadas com 300 nM de DAPI observadas em objetiva de aumento 100x através da microscopia de fluorescência utilizando filtro de 420 nm.

5.4 Análise da alteração nas fases do ciclo celular

Além da determinação da taxa de apoptose, foi realizada uma análise complementar de ciclo celular, com a intenção de observar as possíveis alterações no ciclo celular e a possível correlação com a taxa de apoptose observada anteriormente. Dessa forma, células Jurkat foram estimuladas durante 72 horas com 200 nM de proteína Tat. Após o período de estímulo, as células foram marcadas com o PI, 10.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo sendo em seguida analisados no programa FlowJo®.

Conforme observado na Figura 13, o *gate* foi definido de forma que fosse possível analisar a maior quantidade possível de eventos. Em seguida, a análise das fases do ciclo celular foi realizada através do gráfico de histograma tendo como base a intensidade de fluorescência no canal do PerCP (Peridina Clorofil 2), sendo a extensão de cada fase determinada com base na intensidade de fluorescência do controle não estimulado. Durante a aquisição dos eventos, fixou-se o pico das células na fase G1 em 400k de fluorescência. Dessa forma, entre 450 e 750k de fluorescência estão as células que se encontram em fase S do ciclo celular, pois o PI é um intercalante de DNA e o processo de replicação do material genético, conseqüentemente, leva ao aumento do nível de fluorescência. Sendo assim, eventos compreendidos entre 750k e 1.000k de fluorescência, correspondem às células que em fase G2 do ciclo celular, pois apresentam o dobro de material genético das células em G1. Além disso, as células compreendidas na fase sub-G1 correspondem aos corpos apoptóticos que apresentam o DNA fragmentado.

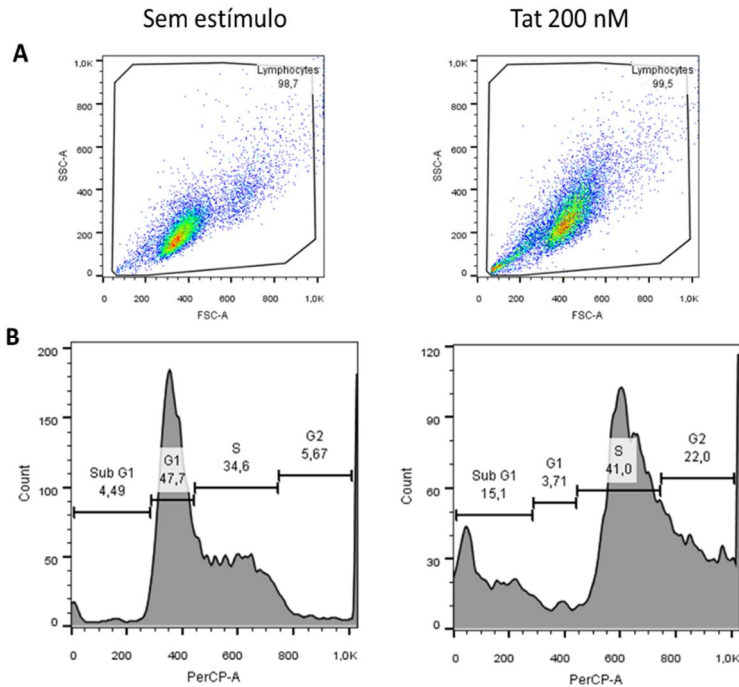


Figura 13. Determinação da frequência de células Jurkat em diferentes fases do ciclo celular. (A) Representação da seleção do *gate* e a distribuição dos eventos em função do tamanho (FSC-A) e a complexidade intracelular (SSC-A) de células Jurkat estimuladas ou não com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas. (B) Demonstração das fases do ciclo celular com base nos níveis de fluorescência de células marcadas com iodeto de propídeo e a frequência das células em cada fase. Sub-G1: morte celular; G1: células em repouso; S: células em processo de replicação do material genético; G2: células em processo de divisão celular.

Com base nos histogramas, constata-se em uma análise visual que há uma alteração no perfil do ciclo celular quando células são estimuladas com a proteína Tat. A inversão no perfil fica evidente tendo a fase G1 como parâmetro, pois observa-se que no controle 47,7% das células estão nessa fase do ciclo (Figura 13 A), enquanto células estimuladas apresentam 3,71% das células na mesma fase (Figura 13 B).

A análise individual de cada uma das fases do ciclo celular foi realizada com base no número de células, conforme demonstrado na Figura 14, sendo que, células Jurkat que foram estimuladas com etoposídeo foram consideradas como controle positivo de apoptose e de

alteração do ciclo celular. Tendo o etoposídeo como parâmetro de comparação, evidenciou-se que células em apoptose que apresentam a fragmentação do material genético se concentram na fase sub-G1 do ciclo. Ademais, constatou-se que células estimuladas com a proteína Tat tem um aumento significativo no número de células apoptóticas, reforçando os resultados apresentados no item 6.5. O número de células em fase G1 foi drasticamente diminuído após a estimulação, no entanto o estímulo com a proteína Tat induziu um aumento significativo no número de células em fase S, sendo que esse aumento também foi observado na fase G2.

Estes dados em conjunto concluem o terceiro objetivo deste trabalho sendo que, observou-se que o estímulo com a proteína Tat altera significativamente o tamanho e complexidade das células Jurkat e induz parada do ciclo celular entre as fases S e G2.

Análise da alteração nas fases do ciclo celular em células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat

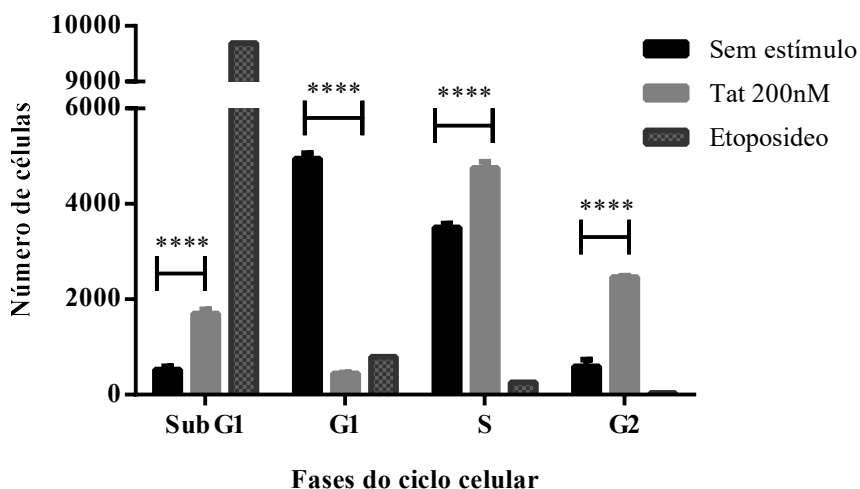


Figura 14. Análise da alteração nas fases do ciclo celular em células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat. Número de células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas em cada fase do ciclo celular. O controle negativo representado por células sem estímulo e células

estimuladas com 1 μ M de etoposídeo representam o controle positivo. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$.

5.5 Análise da despolarização de membrana de mitocôndria

Após a verificação da indução de apoptose, foi determinada a participação da mitocôndria nesse processo de morte celular. Uma das maneiras de avaliar a atividade mitocondrial é através da marcação da membrana da organela com uma sonda que permite identificar os níveis de sua polarização. Com a perda da polarização das membranas, a mitocôndria não consegue mais realizar a cadeia transportadora de elétrons, levando a uma inibição geral na produção de energia. Além disso, a despolarização das membranas, ocasiona o extravasamento do conteúdo intramembranar que atuará nas vias intrínseca e extrínseca de apoptose.

Com o objetivo de avaliar se as células estimuladas com a proteína Tat sofriam alguma alteração no perfil de polarização da membrana mitocondrial, células foram estimuladas com 200 nM da proteína Tat e incubadas por 72 horas. Após o período de incubação, as células foram recolhidas do poço e marcadas com a sonda MitoView. Em seguida 50.000 eventos foram adquiridos no citometro de fluxo e analisados utilizando o programa Flow Jo.

A análise dos resultados, demonstrada na Figura 15, foi realizada através do gráfico de *Dotplot* utilizando os parâmetros SSC e da fluorescência da sonda no canal APC (Aloficocianina) e da análise do gráfico de histograma que demonstra a distribuição do número de células de acordo com o nível de fluorescência. Foi possível observar a presença de duas populações distintas no *Dotplot* enquanto no histograma foi observada a ocorrência de dois picos. Em células com mitocôndrias normais a sonda fluorescente se intercala na membrana íntegra da organela, gerando assim altos níveis de fluorescência. O contrário acontece quando as membranas mitocondriais perdem a sua polarização como consequência as células passam a emitir menor intensidade de fluorescência.

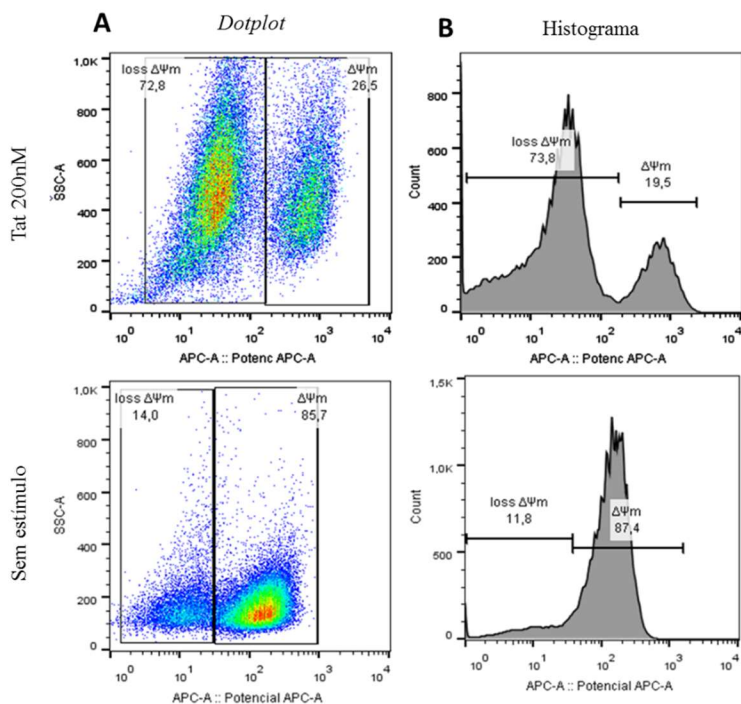


Figura 15. Representação da análise de despolarização de membrana de mitocôndria de células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat. (A) Dotplot demonstrando a distribuição das células por tamanho (SSC-A) e níveis de fluorescência da sonda *MitoView-APC* e a seleção dos *gates* de células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat e células sem estímulo após incubação de 72 horas. **(B) Histograma** demonstrando a frequência de células de acordo com os níveis de fluorescência da sonda, onde *loss $\Delta\Psi_m$* indica a perda do potencial de membrana e *$\Delta\Psi_m$* a integridade da mesma.

Observou-se que as células se agruparam de acordo com a intensidade de fluorescência sendo possível determinar o número de células que perderam o potencial de membrana mitocondrial. Foi observado, que 72 horas de estímulo com a proteína Tat induziu despolarização da membrana mitocondrial de aproximadamente 74% das células, enquanto células não estimuladas apresentaram apenas 11,8% de células com despolarização da membrana da mitocôndria (Figura 15).

Foi possível observar ainda na Figura 16 que houve um aumento significativo no número de células que apresentaram despolarização da membrana da mitocôndria quando estimuladas. Tendo em vista que a despolarização da membrana mitocondrial é um passo para a depleção de energia na célula, com conseqüente indução de apoptose, acredita-se fortemente que os 74% das células estimuladas que apresentaram níveis de despolarização, de forma tempo-dependente, deveriam entrar em processo de apoptose.

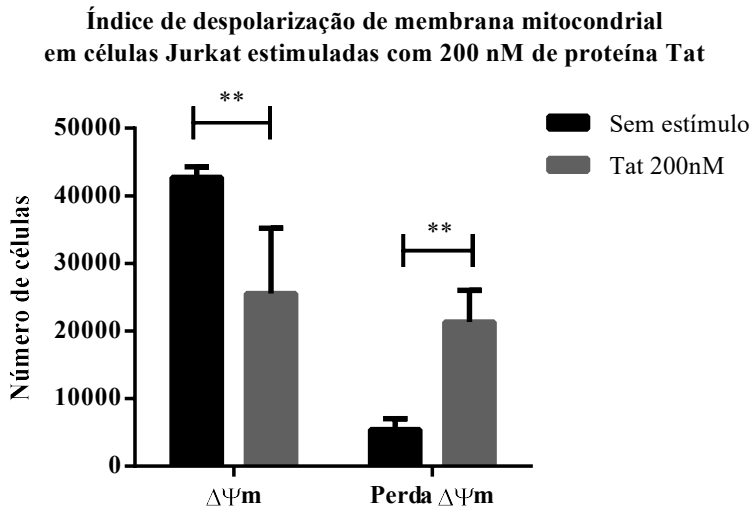


Figura 16. Índice de despolarização de membrana mitocondrial em células Jurkat estimuladas com 200 nM de proteína Tat. Células Jurkat foram estimuladas ou não com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas e foi avaliado se houve despolarização da membrana de mitocôndria (Perda $\Delta\Psi_m$) ou se células mantiveram integridade membranar ($\Delta\Psi_m$). A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (**) $p < 0,001$.

5.6 Avaliação da ativação de caspase -12, -3 e -8.

As caspases são proteínas da família das proteases que representam mediadores centrais na indução de apoptose em mamíferos. Com o objetivo de avaliar a ativação das caspases -12, -3 e -8, células Jurkat foram estimuladas durante 72 horas com 200 nM da proteína Tat, sendo determinada a ativação através da clivagem de substratos específicos. Verificou-se que o estímulo com a proteína Tat induz apoptose mediada

através da ativação da caspase-12 iniciadora (Figura 17) e ativação da caspase-3 executora (Figura 18). No entanto, foi observado a diminuição significativa na atividade da caspase -8 em células estimuladas com a proteína Tat (Figura 19).

Estes resultados em conjunto concluem o quarto objetivo deste trabalho, onde foi observado a ativação das caspases que serão diretamente responsáveis pela execução da morte celular.

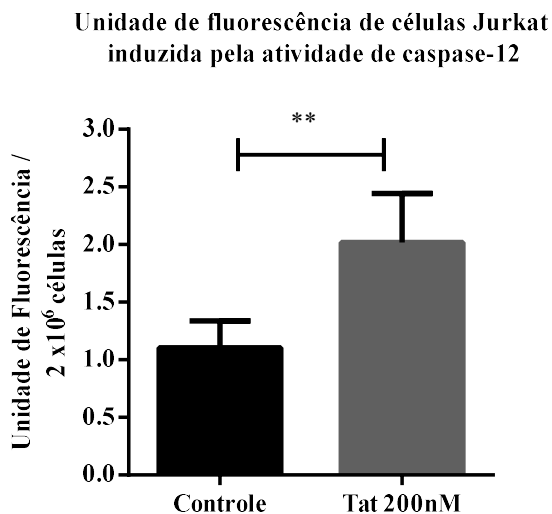


Figura 17. Unidade de fluorescência produzida pela atividade de caspase-12 em células Jurkat estimuladas com a proteína Tat. Índice de atividade de caspase-12 em 2×10^6 células estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas; o controle são células sem estímulo. A diferença significativa foi observada através do teste t não-pareado onde (**) $p < 0,0092$.

Unidade de fluorescência de células Jurkat induzida
pela atividade de caspase-3

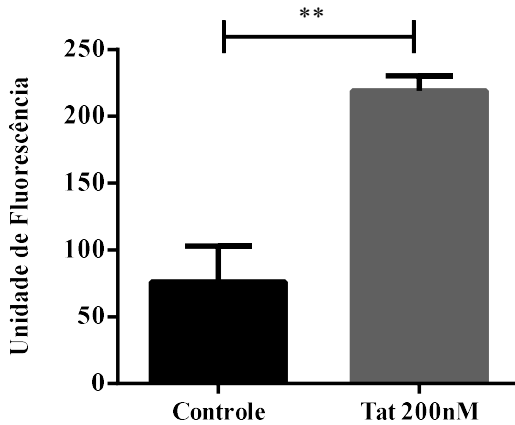


Figura 18. Unidade de fluorescência produzida pela atividade de caspase-3 em células Jurkat estimuladas com a proteína Tat. Índice de atividade de caspase-3 em 2×10^6 células estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas; o controle são células sem estímulo. A diferença significativa foi observada através do teste t não-pareado onde (**) $p < 0,0011$.

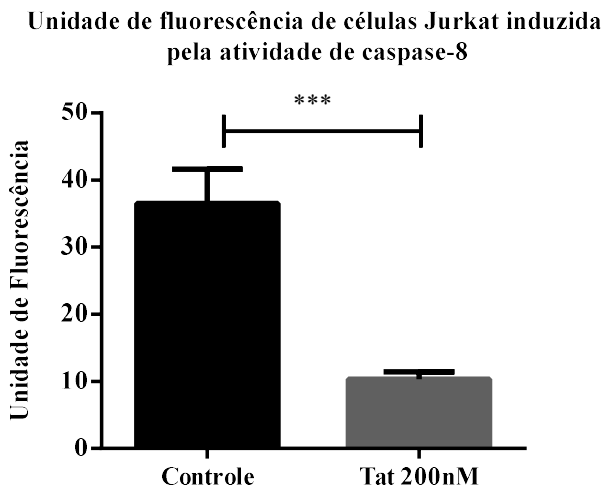


Figura 19. Unidade de fluorescência produzida pela atividade de caspase-8 em células Jurkat estimuladas com a proteína Tat. Índice de atividade de caspase-8 em 2×10^6 células estimuladas com 200 nM de proteína Tat durante 72 horas; o controle são células sem estímulo. A diferença significativa foi observada através do teste t não-pareado onde (***) $p < 0,00010$.

5.7 Avaliação dos níveis de transcritos de genes da via UPR

5.7.1 Análise de especificidade e eficiência dos iniciadores para qPCR e escolha dos genes de referência

A fim de garantir a confiabilidade da análise de expressão gênica foi necessário avaliar tanto a especificidade e eficiência dos iniciadores, quanto determinar quais seriam os genes de referência mais estáveis para células Jurkat. Dessa maneira, após a extração do RNA total a pureza dos mesmos foi verificada através da razão espectrofotométrica 260/280 nm; tendo sido considerada aceitável, foi realizada a síntese do cDNA utilizando a concentração fixa de 5 μ g de RNA total.

Posteriormente à escolha dos iniciadores, foram realizadas análises de especificidade e eficiência das reações. Para cada par de iniciador utilizou-se uma curva-padrão construída com um *pool* das amostras a serem analisadas, diluídas de forma seriada na razão 4 partindo-se de

uma concentração inicial de 5 μg de RNA para a síntese do cDNA. A análise da especificidade foi realizada através da observação da curva de dissociação gerada ao final da reação de qPCR, sendo a principal característica uma curva com pico único e específico que demonstra a temperatura de *melting* (T_M). Conforme pode ser observado as curvas de dissociação das reações indicaram a presença de um produto específico para todos os genes de interesse (Figuras 20 e 21) e de referência (Figura 22) sem a presença de dímeros de iniciadores ou picos inespecíficos.

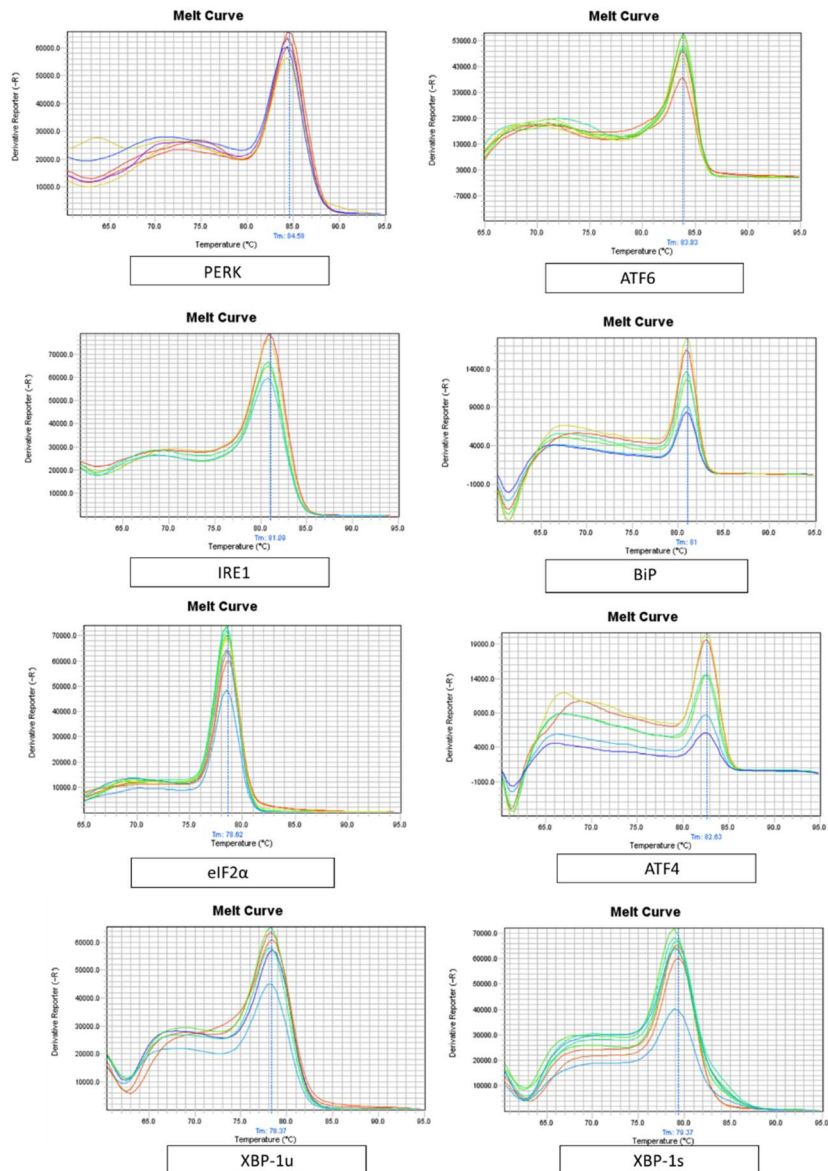


Figura 20. Análise da especificidade dos iniciadores dos genes da via UPR. Perfis das curvas de dissociação dos genes de ativação da via UPR (PERK, ATF6, IRE1, BiP, eIF2 α , ATF4, XBP1-u e XBP1-s).

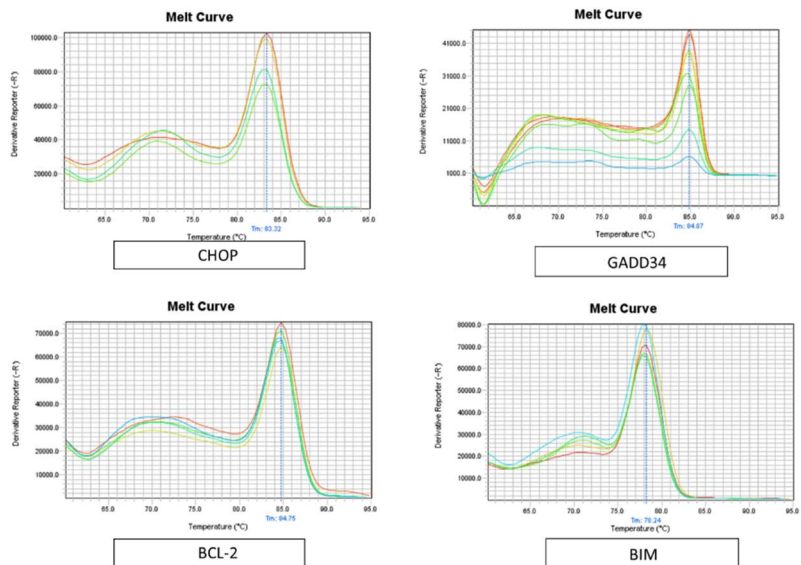


Figura 21. Análise da especificidade dos iniciadores dos genes da via de apoptose. Perfis das curvas de dissociação dos genes relacionados a apoptose mediada pela ativação da via UPR (CHOP, GADD34, BIM e BCL-2).

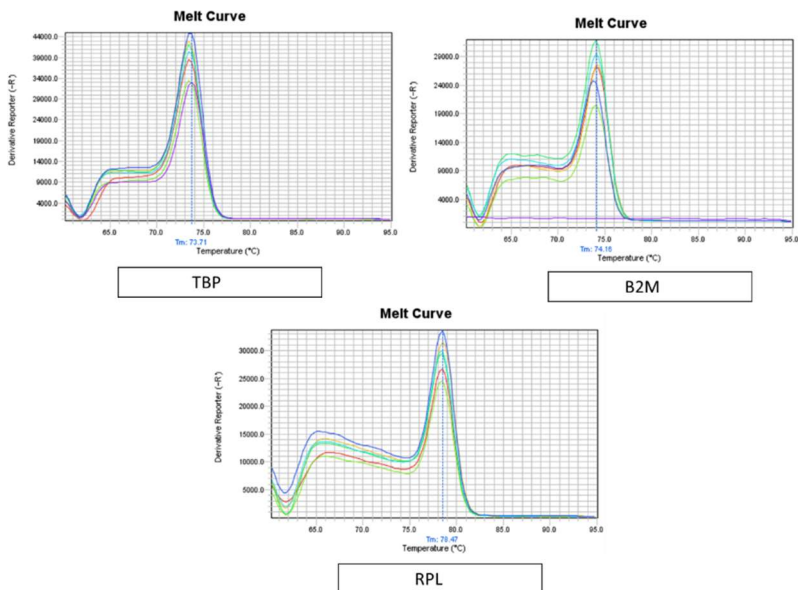


Figura 22. Análise da especificidade dos iniciadores dos genes normalizadores. Perfis das curvas de dissociação dos genes de referência (TBP, B2M e RPL).

A verificação das eficiências das reações foi realizada por meio da utilização do valor de inclinação da reta obtido após realização da curva padrão para cada gene. Na Tabela 01, estão indicados os valores de inclinação da reta encontrados, assim como os índices de correlação (R^2), o limite de detecção *Y-Intercept* e as eficiências calculadas de cada reação. Os valores de eficiência das reações variaram entre 95,4% (IRE1) e 104,8 (ATF4). Dessa maneira foi possível a escolha do método do Cq Comparativo para as análises dos resultados a serem obtidos.

Tabela 03. Valores dos coeficientes de correlação (R^2), inclinação da reta, Y-interceptação, eficiência e ponto de corte dos pares de iniciadores

	R^2	Inclinação da reta	Y-Inter	Eficiência	Ponto de corte
Genes de interesse					
ATF6	0,977	-3,391	28,754	97,20%	0,208
PERK	0,999	-3,224	29,832	104,26%	0,999
IRE1	0,993	-3,435	35,737	95,48%	0102
BIP	0,937	-3,216	33,8	104,63%	0,05
eIF2 α	0,992	-3,376	20,639	97,80%	0,114
XBPI-u	0,997	-3,426	19,654	95,83%	0,100
XBPI-s	0,991	-3,355	22,803	98,63%	0,139
ATF4	0,931	-3,208	34,96	104,98%	0,08
CHOP	0,984	-3,414	30,701	96,30%	0,137
GADD34	0,949	-3,358	38,281	98.50%	0,121
BIM	0,957	-3,487	35,082	96,81%	0,470
BCL-2	0,996	-3,358	32,367	98,63%	0,105
Genes de referência					
B2M	0,999	-3,397	27,549	99,60%	0,295
TBP	0,996	-3,339	27,437	99,30%	0,292
RPL	0,996	-3,353	25,035	99,30%	0,232

Um gene de referência, além de apresentar especificidade, requer que sua expressão seja estável e constante, independentemente das condições experimentais. Para essa análise de estabilidade, as amostras foram submetidas a reações de RT-qPCR utilizando-se iniciadores para os genes *B2M*, *RPL13A* e *TBP*. Dessa forma, foi utilizada a ferramenta *RefFinder* como objetivo de selecionar os genes de referência que apresentavam maior estabilidade em células Jurkat. Foram testados os valores médios de C_q obtidos nas reações, assim como as médias geométricas obtidas entre os genes avaliados. Ao utilizar a média

geométrica, foi feita uma avaliação dos genes não apenas de forma individual, mas também considerando as médias que serão utilizadas no momento da normalização. De acordo com o resultado gerado pelo programa, considerou-se como genes de referência em células Jurkat a média geométrica de *B2M*, *RPL13A* e *TBP* (Figura 23).

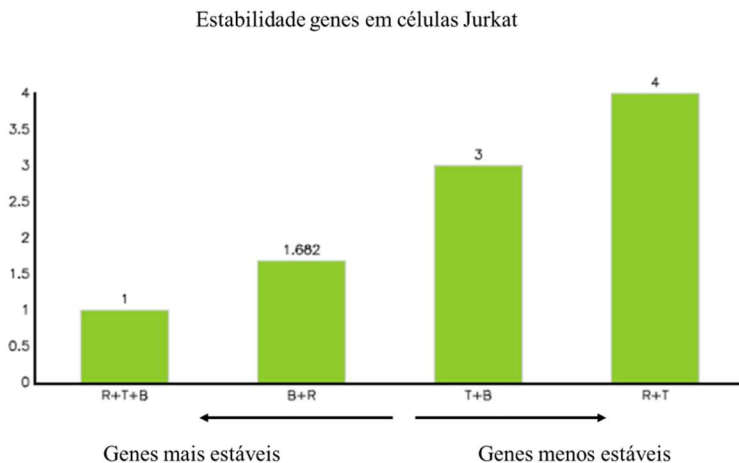


Figura 23. Análise da estabilidade dos genes de referência em células Jurkat. Gráfico gerado pela ferramenta online *RefFinder* indicando a combinação mais estável dos genes em células Jurkat, R: RPL, T: TBP e B: B2M.

5.7.2 Análise do nível de transcritos por RT-qPCR dos genes da via UPR

Com o objetivo de avaliar a expressão gênica relativa de ATF6, PERK, IRE1, BiP, EIF2 α , XBP1-u, XBP1-s, ATF4, foram realizadas reações de qPCR conforme descrito anteriormente utilizando o cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído de células Jurkat estimuladas com 50, 100 e 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 e 72 horas. Os valores de C_q gerados foram transformados em 2^{- Δ C_q} para serem realizadas as análises estatísticas e obtenção dos resultados apresentados a seguir. Considerou-se a média geométrica dos genes B2M, RPL e TBP como normalizadores da expressão global das células Jurkat. Para a análise das diferenças na expressão relativa, foram utilizadas amostras calibradoras que neste estudo foram os controles não estimulados em

cada um dos tempos 24, 48 e 72 horas. Os valores de Cq obtidos foram transformados em ΔCq e a média deles foi utilizada para a obtenção dos valores de $2^{-\Delta Cq}$ das amostras. A análise estatística dos valores de expressão gênica relativa foi realizada através do programa *GraphPad Prisma 6*, utilizando a análise ANOVA (análise de variância) de duas vias multicomparativa e pós-teste de *Turkey*.

Observou-se que células estimuladas com 50, 100 e 200 nM de proteína Tat, apresentaram um aumento significativo no nível de transcritos do gene de ATF6 após 72 horas de estímulo (Figura 24), indicando que a ativação desse braço da via UPR ocorreu de maneira tempo-dependente. No entanto a expressão relativa de ATF6 parece apresentar uma correlação negativa com dose de Tat. Observou-se que o estímulo com 50 nM de Tat apresentou maior expressão relativa de ATF6 quando comparada com 100 e 200 nM.

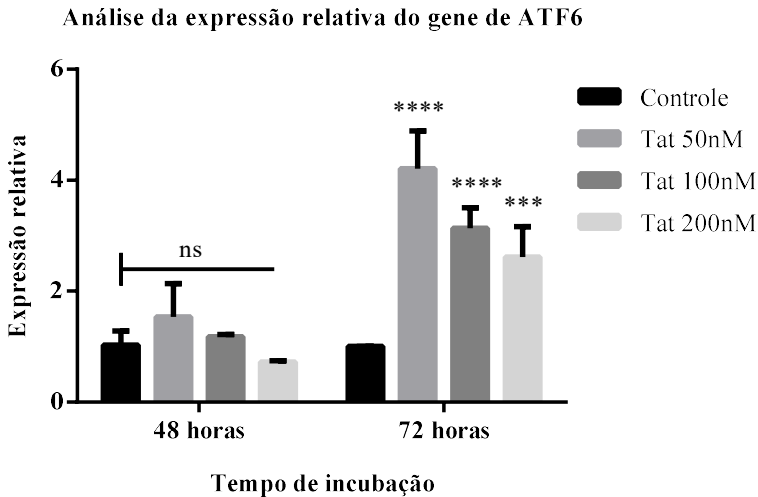


Figura 24. Análise da expressão relativa do gene de ATF6. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$, (***) $p < 0,001$ e ns não significativo.

Observou-se que a expressão relativa do gene de PERK sofreu uma ativação após 24 horas de estímulo com 100 e 200 nM de proteína Tat e

que essa expressão foi reduzida à níveis basais 48 horas após o estímulo. Curiosamente, após 72 horas de estímulo com 50, 100 e 200nM a expressão relativa de PERK foi significativamente aumentada (Figura 25), demonstrando assim, que a ativação do braço PERK da via UPR foi ativado em resposta ao estímulo com a proteína Tat e que essa ativação não parece ter relação com a dose de proteína e o tempo de estímulo.

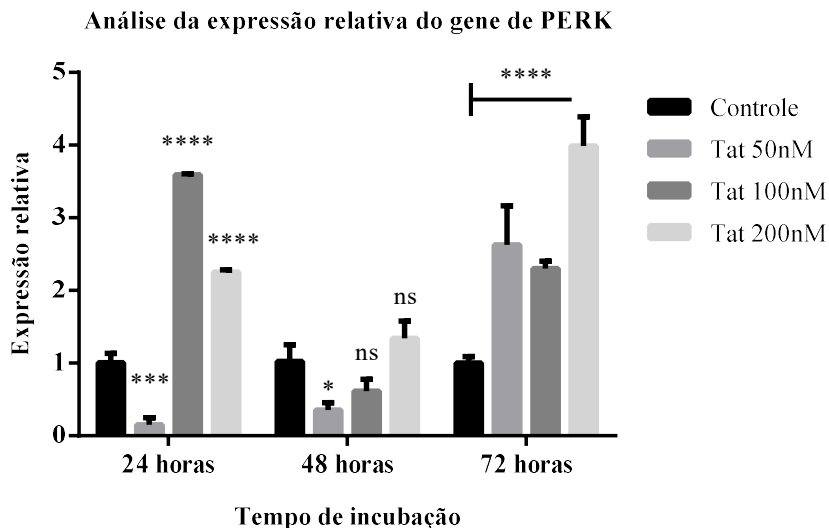


Figura 25. Análise da expressão relativa do gene de PERK. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$, (***) $p < 0,001$, (*) $p < 0,01$ e ns não significativo.

Observou-se que nas primeiras 48 horas de estímulo com a proteína Tat, não houve alterações nos níveis de transcritos do gene de IRE1. No entanto, após 72 horas de estímulo com 50, 100 e 200 nM de proteína Tat, observou-se um aumento significativo na expressão relativa de IRE1 (Figura 26). Indicando assim, que a ativação do braço IRE1 aconteceu de forma tempo-dependente, bem como a dose de Tat parece ter uma correlação positiva com o aumento da expressão de IRE1.

Análise da expressão relativa do gene de IRE1

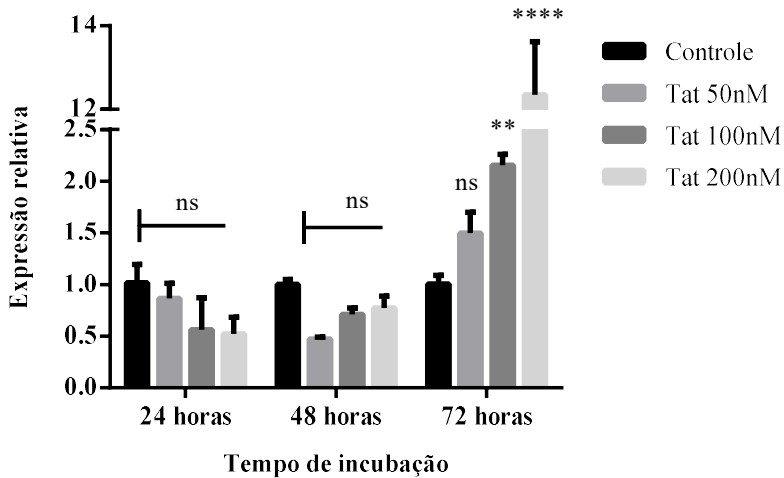


Figura 26. Análise da expressão relativa do gene de IRE1. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$, (**) $p < 0,001$ e ns não significativo.

Sabendo que BiP é uma das primeiras moléculas que apresentam sua expressão aumentada durante o estresse de RE, foi avaliada a expressão gênica relativa de BiP após estímulo com Tat (Figura 27). Observou-se que nas primeiras 48 horas de estímulo, a expressão relativa de BiP permanece inalterada. No entanto, após 72 horas de estímulo com 50, 100 e 200 nM de Tat houve um aumento significativa na expressão de BiP. Indicando que a indução de estresse de RE aconteceu de forma tempo-dependente e que a dose de 100 e 200 nM é capaz de induzir maior expressão desse gene quando comparado com a dose de 50 nM.

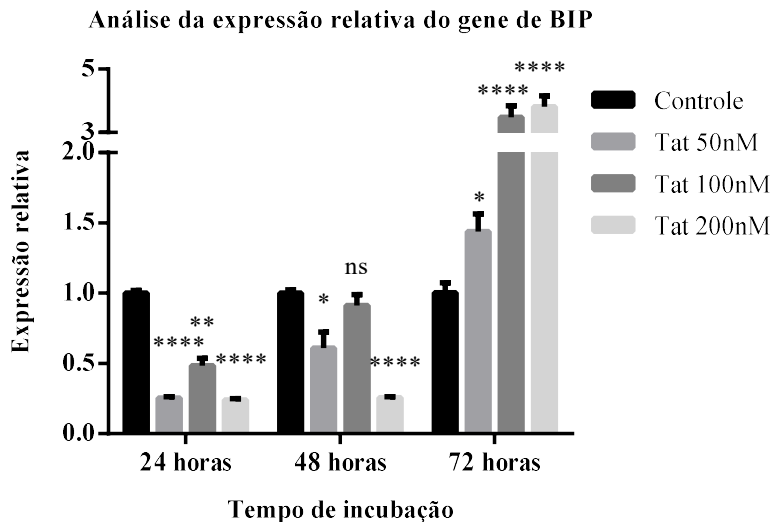


Figura 27. Análise da expressão relativa do gene de BIP. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$, (**) $p < 0,001$, (*) $p < 0,01$ e ns não significativo.

A molécula eIF2 α está relacionada com a ativação do braço PERK da via UPR, uma vez determinado que a proteína Tat é capaz de induzir aumento na expressão relativa de PERK, analisou-se a possível influência dessa ativação na expressão relativa do gene de eIF2 α . Observou-se que nas primeiras 24 horas após o estímulo com 50, 100 e 200 nM de Tat, há uma significativa redução nos níveis de transcritos do gene de eIF2 α que posteriormente, após 48 horas de estímulo, são reestabelecidos e voltam ao seu nível basal (Figura 28). No entanto, após 72 horas de estímulo observou-se um aumento significativo na expressão relativa desse gene, indicando que ativação desse gene ocorre de forma tempo e dose-dependente.

Análise da expressão relativa do gene de eIF2 α

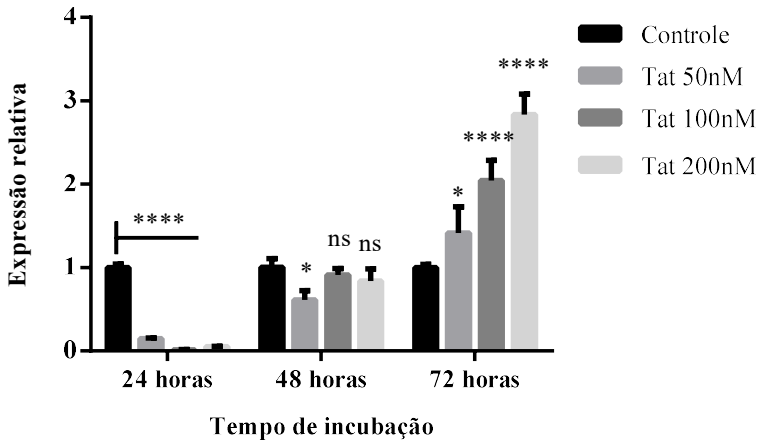


Figura 28. Análise da expressão relativa do gene de eIF2 α . Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$, (*) $p < 0,01$ e ns não significativo.

Após ter sido observado que a ativação do braço IRE1 ocorre de maneira tempo-dependente, analisou-se a expressão relativa de duas moléculas que são ativadas por IRE1, XBP-1 na sua forma original ou *unspliced* (XBP1-u) e a sua forma ativa ou *spliced* (XBP1-s). Observou-se que após 48 horas houve um pico de expressão de XBP1-u em resposta ao estímulo com 100 e 200 nM de Tat (Figura 29). Observou-se também, que apesar de continuar apresentando um aumento significativo na expressão deste gene nos estímulos com 100 e 200 nM, observou-se que em 72 horas de estímulo uma diminuição considerável na expressão relativa de XBP1-u quando comparado com 48 horas.

Análise da expressão relativa do gene de XBP1-u

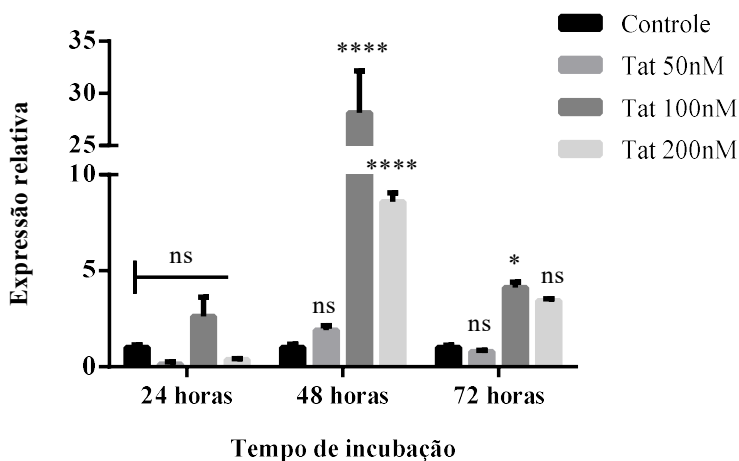


Figura 29. Análise da expressão relativa do gene de XBP1-u. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$, (*) $p < 0,01$ e ns não significativo.

Ao analisar a expressão relativa de XBP1-s (Figura 30), observou-se que o estímulo com 50, 100 e 200 nM de proteína Tat apresentam perfis completamente distintos entre si na expressão relativa desse gene. Observou-se que o estímulo com 50 nM de Tat não alterou a expressão de XBP1-s em nenhum dos tempos analisados, enquanto estímulo com 100 nM foi capaz de induzir um aumento robusto na expressão desse gene em 24 horas mas que no entanto, foi sendo gradativamente diminuindo com o passar do tempo. Observou-se ainda que o estímulo com 200 nM de proteína Tat foi capaz de induzir um aumento significativo da expressão relativa de XBP1-s primeiramente após 48 horas e continuou aumentando após 72 horas de estímulo (Figura 30). Em conjunto, estes dados demonstram que assim como a expressão da molécula XBP1, sua ativação em forma de XBP1-s também aumenta de forma dose-dependente.

Análise da expressão relativa do gene de XBP1-s

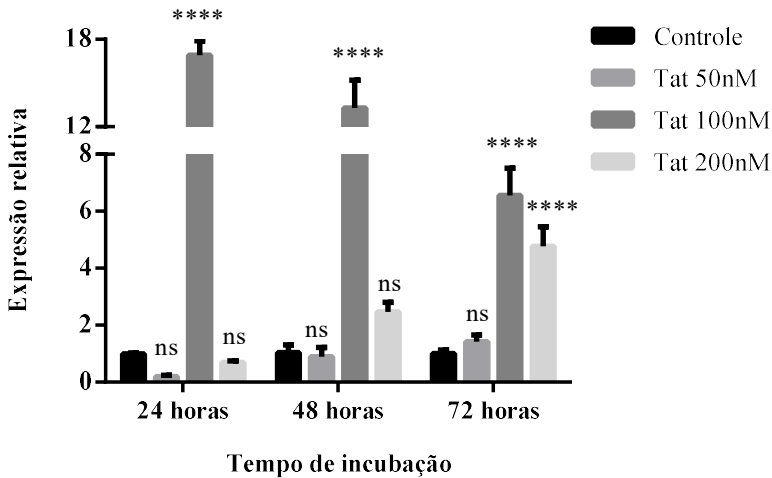


Figura 30. Análise da expressão relativa do gene de XBP1-s. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,0001$, e ns não significativo.

Após ter sido observado que a molécula eIF2 α tem sua expressão relativa aumentada de forma tempo e dose-dependente, avaliou-se a expressão relativa do gene de ATF4 que é um fator de transcrição que tem sua expressão regulada por eIF2 α . Observou-se que nas primeiras 48 horas de estímulo com 50 e 100 nM de proteína Tat, a expressão de ATF4 não sofreu nenhuma alteração. No entanto, observou-se que no mesmo período o estímulo com 200 nM induziu uma diminuição significativa na expressão de ATF4. Em contraste, após 72 horas de estímulo com 100 e 200 nM, houve um aumento significativo na expressão desse fator de transcrição (Figura 31). Indicando dessa forma, que aparentemente ocorre primeiro uma regulação negativa desse gene com posterior aumento significativo da expressão em 72 horas.

Estes resultados em conjunto demonstram que o estímulo com a proteína Tat induziu estresse de RE em células Jurkat, com consequente

ativação dos três braços (PERK, IRE1 e ATF6) da via UPR de maneira tempo-dependente e assim concluiu-se o sexto objeto deste trabalho.

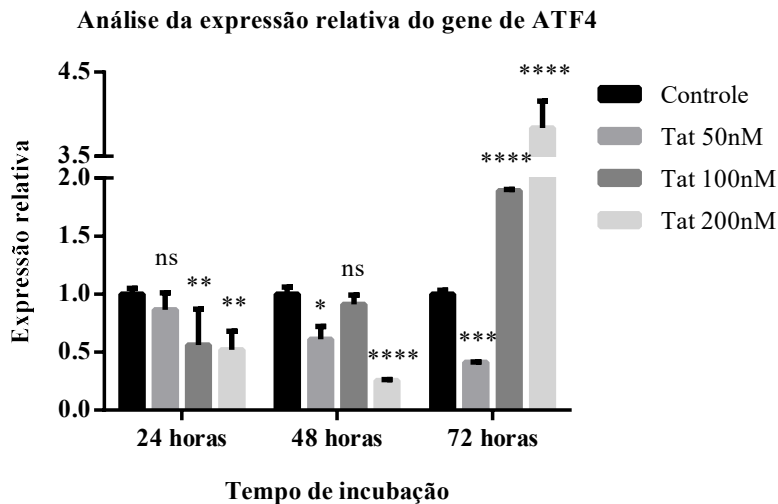


Figura 31. Análise da expressão relativa do gene de ATF4. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,00001$ (***) $p < 0,0001$, (**) $p < 0,001$, (*) $p < 0,01$ e ns não significativo.

5.7.3 Análise do nível de transcritos por RT-qPCR dos genes relacionados a indução de apoptose mediada pelo RE

Após ter sido observada a ativação da via UPR através do aumento da expressão relativa de diversos genes relacionado a essa via, objetivou-se avaliar a expressão gênica relativa dos genes relacionados com a apoptose mediada pelo estresse de RE. Os genes de CHOP, GADD34, BIM e BCL-2 foram analisados por reações de qPCR conforme descrito anteriormente utilizando o cDNA sintetizado a partir do RNA total extraído de células Jurkat estimuladas com 50, 100 e 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 e 72 horas. Os valores de Cq gerados foram transformados em $2^{-\Delta Cq}$ para serem realizadas as análises estatísticas e elaboração dos gráficos apresentados a seguir. Considerou-se a média geométrica dos genes B2M, RPL e TBP como

normalizadores da expressão global das células Jurkat. Para a análise das diferenças na expressão relativa, foram utilizadas amostras calibradoras que, neste estudo, foram os controles não estimulados em cada um dos tempos 24, 48 e 72 horas. Os valores de Cq obtidos foram transformados em ΔCq e a média deles foi utilizada para a obtenção dos valores de $2^{-\Delta Cq}$ das amostras. A análise estatística dos valores de expressão gênica relativa foi realizada através do programa *GraphPad Prisma 6*, utilizando a análise ANOVA (análise de variância) de duas vias multicomparativa e pós-teste de *Turkey*.

O fator de transcrição ATF4 induz a transcrição gênica de CHOP, um fator pró-apoptótico relacionado ao estresse de RE. Uma vez determinado que o estímulo com a proteína Tat é capaz de induzir o aumento da expressão de ATF4, foi realizada a análise da expressão relativa do gene de CHOP. Observou-se que nas primeiras 48 horas de estímulo, a expressão relativa de CHOP não sofreu nenhuma alteração. No entanto, observou-se que após 72 horas de estímulo com 100 e 200 nM de proteína Tat houve um aumento significativo na expressão relativa de CHOP (Figura 32), indicando que, assim como a ativação da via UPR, a indução de apoptose mediada pelo estresse de RE aconteceu de forma tempo-dependente. Além disso, observou-se que, após 72 horas de estímulo, houve uma diferença significativa no aumento da expressão desse gene entre as doses 50, 100 e 200 nM, indicando que a ativação de CHOP ocorreu também de forma dose-dependente.

Análise da expressão relativa do gene de CHOP

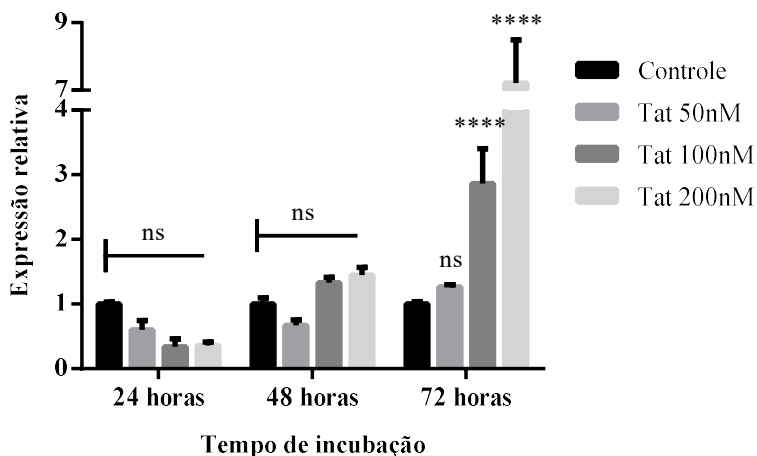


Figura 32. Análise da expressão relativa do gene de CHOP. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,00001$ e ns não significativo.

A ativação de apoptose aconteceu em efeito de cascata, assim como ATF4 induziu a transcrição de CHOP e induziu a transcrição de GADD34. Observou-se que nas primeiras 24 horas, o estímulo com 50, 100 e 200 nM foi capaz de induzir uma significativa diminuição na expressão de GADD34. No entanto, após 48 horas de estímulo, os níveis de transcritos voltaram aos níveis basais (Figura 33). Após 72 horas de estímulo, a doses de proteína Tat induziram um aumento significativo na expressão relativa do gene de GADD34, indicando que, assim como CHOP, a expressão de GADD34 ocorreu de maneira tempo-dependente.

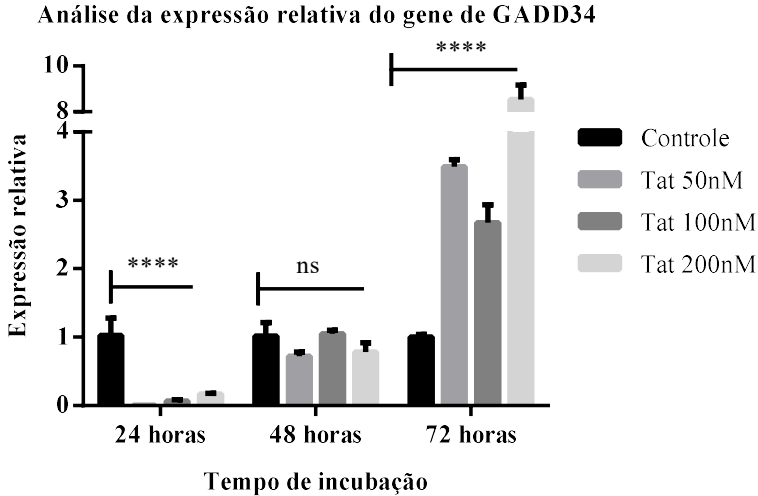


Figura 33. Análise da expressão relativa do gene de GADD34. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,00001$ e ns não significativo.

Em resposta ao estresse, BIM foi translocada para a membrana do RE e induziu apoptose através da ativação de caspase-12. Conforme observado previamente o estímulo com a proteína Tat induziu a ativação de caspase-12. Nesse contexto foi analisada a expressão relativa do gene de BIM e observou-se que o estímulo com 50, 100 e 200 nM de proteína Tat nas primeiras 48 horas não apresentaram nenhuma alteração (Figura 34). No entanto, após 72 horas de estímulo, ambas as concentrações de Tat foram capazes de induzir um aumento significativo na expressão relativa de BIM, indicando que, além da ativação de CHOP, outros mecanismos apoptóticos em resposta ao estresse no RE são ativados de forma tempo-dependente após estímulos com Tat.

Análise da expressão relativa do gene de BIM

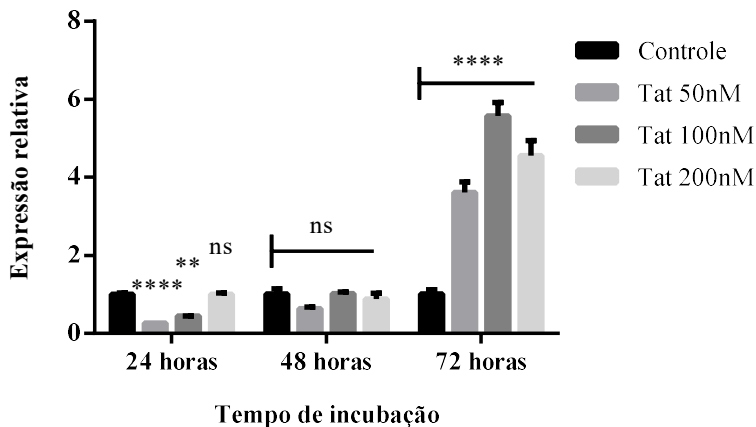


Figura 34. Análise da expressão relativa do gene de BIM. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,00001$, (**) $p < 0,001$ e ns não significativo.

Uma das características da ativação de CHOP é a diminuição da expressão do fator anti-apoptótico BCL-2, nesse sentido, foi realizada a análise da expressão relativa do gene de BCL-2. Observou-se que nas primeiras 48 horas de estímulo com 50, 100 e 200 nM de proteína Tat não induziram alterações nos níveis de transcritos (Figura 35). No entanto, após 72 horas de expressão, houve um aumento significativo da expressão de BCL-2, bem como foi observado que esse aumento apresenta uma correlação positiva com a dose de Tat. Indicando que além de CHOP não estar inibindo, a expressão gênica aumenta de forma tempo e dose-dependente.

Estes resultados em conjunto concluem o último objetivo deste trabalho, onde observou-se que o estímulo com a proteína Tat em células Jurkat induz a ativação de genes relacionados a apoptose mediada pela via UPR em resposta ao estresse de RE.

Análise da expressão da expressão relativa de BCL-2

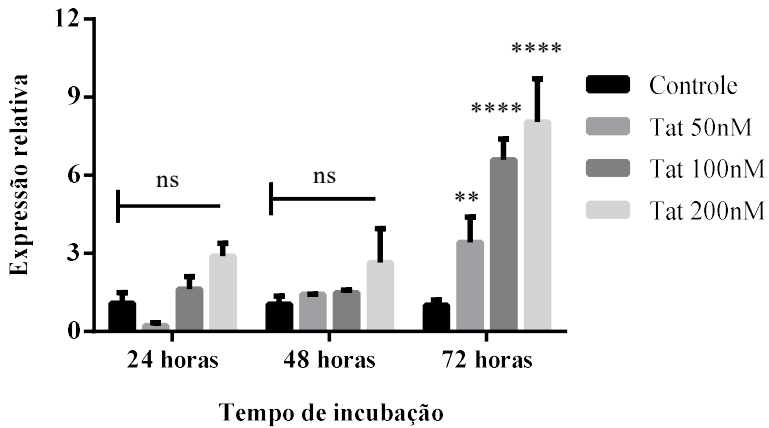


Figura 35. Análise da expressão relativa do gene de BCL-2. Nível de expressão gênica relativa em células Jurkat estimuladas com 50 nM, 100 nM ou 200 nM de proteína Tat durante 24, 48 ou 72 horas. Células sem estímulo representam o controle e normalizador dos níveis de expressão. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde (****) $p < 0,00001$, (**) $p < 0,001$ e ns não significativo.

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade da proteína Tat do HIV-1 em ativar mecanismos de apoptose em linfócitos e correlacionar esta morte com a ativação da via UPR. Para isso, foram utilizadas células Jurkat E6-1 que é uma linhagem celular humana imortalizada proveniente de leucemia aguda de células T CD4, sendo um modelo amplamente utilizado para estudos *in vitro* de interação de diferentes moléculas do HIV com a célula hospedeira (CHEN, N. Y. et al., 2016; MARINO et al., 2016; RUIZ; PRASAD, 2016).

As células Jurkat são produtoras de interleucina-2 (IL-2), uma importante citocina considerada um fator de crescimento que apresenta efeito autócrino, induzindo a multiplicação e expansão da população celular. A produção de IL-2 faz das células Jurkat uma ótima ferramenta de estudo pois apresentam uma taxa de multiplicação acelerada, sendo que, a fase de crescimento exponencial ocorre entre 24 e 120 horas, seguida de uma fase estacionária entre 120 e 144 horas (SOURANI et al., 2016). Entretanto, essa característica particular pode se tornar uma dificuldade quando precisa-se incubar essas células em placas com áreas menores, visto que a multiplicação celular gera metabólitos secundários que são liberados, alterando as características físico-química do meio de cultura. Sabe-se que essas pequenas alterações, como a queda nos níveis de glicose e ATP e aminoácidos essenciais bem como o desequilíbrio do balanço osmótico, podem gerar estresse celular e diminuir consideravelmente a viabilidade celular (SCHRODER, 2006;2008). Nesse contexto, a padronização das condições ideais de cultivo foi determinante para garantir que a multiplicação celular não excedesse a capacidade do meio de cultura em fornecer nutrientes e osmolaridade adequadas.

A proteína Tat foi inicialmente identificada como ativadora da transcrição dos genes do HIV (FISHER et al., 1986), sendo uma proteína rapidamente produzida durante a infecção viral (CAMPBELL; LORET, 2009). O alongamento dos mRNAs virais é prejudicado devido à formação de um *hairpin* com TAR (do inglês, *transactivation responsive element*) que está presente no terminal 5' de todos os mRNAs transcritos e forma um complexo que bloqueia a RNA polimerase (CAMPBELL; LORET, 2009). Ao ligar-se a região de TAR, Tat libera o *hairpin* formado e permite o alongamento do mRNA (LORET et al., 1992). A análise das sequências de Tat provenientes de 5

subtipos virais mais comuns circulantes no mundo (A, B, C, D e E), demonstrou que, apesar delas aparentemente desempenharem mesmas funções, a diversidade entre as sequências chega a 40% (CAMPBELL et al., 2007). Sabendo da variabilidade no tamanho e composição aminoacídica da proteína Tat nos diferentes subtipos virais (PUGLIESE et al., 2005; SCHWARZE et al., 1999), para esse estudo a escolha da proteína recombinante foi baseada na elevada prevalência da circulação do HIV-1 subtipo C no sul do Brasil (GRAF; PINTO, 2013). A proteína recombinante utilizada neste estudo foi comercialmente adquirida da empresa Diatheva (Fano, Itália), sendo que, a sequência completa encontra-se no GenBank sob número de acesso AAL06113.1. A proteína recombinante foi purificada e apresenta pureza superior a 90%, estando livre de endotoxinas e tendo sido confirmada a sua capacidade de *uptake* celular.

A liberação de Tat pelas células infectadas têm sido amplamente relatada através da detecção de anticorpos anti-Tat no soro de pacientes em diversos estudos clínicos (BACHANI et al., 2013; BELLINO et al., 2014; CHEN, Q. et al., 2013; MEDIOUNI et al., 2011; VAN BAALEN et al., 1997). Da mesma forma, foi identificado que indivíduos infectados podem apresentar diferentes concentrações séricas dessa proteína, em valores variando de 2 a 40 ng/ml de sangue, determinados através de ELISA. Estes valores podem estar subestimados pelas seguintes razões: i) as concentrações de Tat serão muito maiores nos órgãos linfoides secundários, onde estão concentradas a maioria dos linfócitos infectados; ii) a proteína Tat no plasma pode estar conjugada à proteínas endógenas ou pode ser neutralizada pelos anticorpos anti-Tat e dessa forma sua biodisponibilidade é afetada prejudicando a sua dosagem através da técnica de ELISA; iii) o método imunoenzimático (ELISA) utilizado pode não ser a melhor maneira de detectar a proteína (XIAO et al., 2000). Sendo assim, enquanto um método mais confiável de detecção dessa proteína *in vivo* não for desenvolvido, a quantidade total de proteína Tat e a implicação biológica dessa circulação não poderão ser inteiramente estabelecidos. Assim sendo, para determinar-se as possíveis atividades biológicas exercidas pela proteína Tat, fazem-se necessários estudos *in vitro* onde seja possível controlar as variações ambientais e determinar o número exato de células expostas à concentrações conhecidas da proteína Tat.

Estudos anteriores avaliaram a capacidade da proteína Tat em induzir apoptose em diferentes células *in vitro*, sendo que as concentrações utilizadas variaram de 10 a 100 nM (LIAO et al., 2012), 50 a 250 nM (MA, R. et al., 2016) e 1 a 16 μ M (LIU, M. et al., 2014). Tendo como base as informações apresentadas, decidiu-se que células Jurkat seriam estimuladas com 3 concentrações de proteína Tat (50, 100 ou 200 nM) e analisadas em 3 tempos distintos. Foi possível observar que a indução de apoptose nas células estimuladas é tempo e dose dependente (Figura 08). Observou-se que o estímulo durante 72 horas com 200 nM de Tat foi capaz de induzir apoptose em 12,05% das células, enquanto o controle não estimulado apresentou uma taxa de apoptose de 2,54% (Figura 09). Um fenômeno semelhante havia sido descrito por Liao e colaboradores (2012), onde 100 nM de proteína Tat foi capaz de induzir apoptose em 18% de células Jurkat, quando o controle não estimulado apresentou uma taxa de 7,36%. Dessa forma, decidiu-se repetir o ensaio de estimulação com as triplicatas técnicas utilizando apenas a concentração de 200 nM de proteína, afim de confirmar que a indução de apoptose observada é tempo-dependente.

Conforme descrito em estudos anteriores, altas concentrações de proteína Tat inibem a proliferação celular em cultura e promovem apoptose em células não infectadas pelo HIV (CAMPBELL; LORET; SPECTOR, 2010; LI, C. J. et al., 1995; WESTENDORP et al., 1995). Da mesma forma, confirmou-se neste estudo que 200 nM de proteína Tat durante 72 horas de estímulo onde foi capaz de induzir apoptose em células Jurkat. Com base em diversas propriedades dessa proteína, tais como ser secretada pelas células infectadas e ter uma função em células não infectadas (LAMONT et al., 1991), sendo muito provável que se acumule no tecido linfóide onde a replicação viral permanece ativa até mesmo durante a fase de latência clínica (HO et al., 1995), aparentemente afetando a expressão dos genes celulares (BUONAGURO et al., 1995) e atuando como “toxina vital (LIAO et al., 2012); hipotetizou-se que Tat poderia estar envolvida na indução de apoptose em linfócitos através do seu efeito *bystander*. Estudos anteriores corroboram essa hipótese, através da marcação *in situ* de linfonodos de crianças HIV-positivas e de macacos SIV-positivos foi demonstrado que a apoptose observada nos linfonodos ocorre predominantemente em células não infectadas, através do efeito *bystander*, enquanto células em estado de infecção produtiva mantem-se viáveis (FINKEL et al., 1995). Este mesmo fenômeno foi observado em

um estudo *in vitro* utilizando uma co-cultura de células CD4⁺ infectadas e não infectadas, onde observou-se que enquanto as células CD4⁺ não infectadas morrem por apoptose, as células infectadas se tornam resistentes à morte celular induzida pelo HIV (NARDELLI et al., 1995). Tendo como base estes estudos acredita-se o papel da proteína Tat na patogênese do HIV vai além da sua função na transcrição viral, podendo este, constituir um importante mecanismo de depleção de linfócitos na patogênese do HIV.

Além disso, o estímulo com 200 nM de Tat evidenciou uma redução na proliferação celular em 44,4%, sendo que este mesmo fenômeno já havia sido reportado anteriormente com uma média de 28% de inibição (LIAO et al., 2012). Uma das explicações para essa diminuição no número de células é a indução de apoptose observada após 72 horas de estímulo. Adicionalmente, uma possível explicação para esse fenômeno, baseia-se nas alterações nas fases do ciclo celular observados na Figura 10, onde foi possível observar que aproximadamente 63% das células estavam concentradas entre as fases S e G2 do ciclo celular, enquanto células não estimuladas essa porcentagem foi de 39%. As mesmas células estimuladas com 200 nM de proteína Tat foram então marcadas com DAPI e visualizadas na microscopia de fluorescência. Observou-se que, quando expostas à proteína Tat, as células apresentaram-se com o núcleo fragmentado, indicando a formação de corpos apoptóticos (Figura 12 B), uma característica marcante de morte celular por apoptose, corroborando assim com os dados apresentados na Figura 09, demonstrando a indução de apoptose em células Jurkat expostas à proteína Tat. Além disso, observou-se também que células estimuladas apresentaram algumas anomalias estruturais, tais como, tamanho aumentado, ausência de membrana nuclear e nucléolos e a perda completa da relação núcleo-citoplasma (Figura 12B). Essas características indicam que essas células podem estar paradas entre as fases S e G2 do ciclo celular, onde deveria ocorrer a condensação dos cromossomos e a membrana nuclear é desfeita para que ocorra a formação do fuso mitótico (FURIA; PELICCI; FARETTA, 2014), sendo essa uma possível explicação para o aumento no número de células concentradas nas fases S e G2 do ciclo quando estimuladas com Tat (Figura 14). Estes resultados em conjunto indicam que as células estimuladas podem estar sob o efeito de um fenômeno previamente descrito, onde foi demonstrado que a proteína Tat impede a progressão da mitose inibindo a formação do fuso mitótico

durante a fase G2 do ciclo celular em células Jurkat (LIU, N. et al., 2014). Em suma, levou-se a crer que as anomalias observadas na microscopia estariam relacionadas com a parada do ciclo celular observada na Figura 14 e esses fenômenos poderiam estar diretamente associados à inibição da proliferação celular. Após a verificação das alterações celulares indicadas através da coloração com DAPI, direcionou-se à análise do perfil da população celular com base no tamanho (FSC-A) e complexidade intracelular (SSC-A) de células analisadas por citometria de fluxo. Observou-se que Tat é capaz de induzir um deslocamento na mediana tanto de FSC-A quanto de SSC-A (Figura 10) de células Jurkat estimuladas. A análise de mediana é essencial para determinar onde está concentrada o centro da distribuição dos eventos no gráfico. Dessa forma, foi possível constatar que células estimuladas com Tat apresentaram-se maiores e mais complexas quando comparadas com o controle não estimulado (Figura 11).

Acredita-se que com o aumento da expressão de diversos genes celulares induzidos por Tat (BELLINO et al., 2014; GANDHI et al., 2009; STETTNER et al., 2009; ZHENG et al., 2005), ocorra uma sobrecarga de proteínas a serem dobradas, podendo dessa forma, induzir estresse de RE com consequente ativação da via UPR. O estresse prolongado de RE é ser responsável pela alteração no fenótipo da via UPR levando a ativação de apoptose através das vias dependente e independente de mitocôndria (NAKAGAWA et al., 2000; YOSHIDA, 2007). Os mecanismos moleculares envolvidos na apoptose mediada pelo estresse de RE ainda não foram completamente elucidados (RON; WALTER, 2007). No entanto, sabe-se que a liberação de cálcio do RE pode estar envolvida na ativação de proteases citoplasmáticas que contribuirão pra a morte celular (NAKAGAWA; YUAN, 2000); porém a forma exata como o estresse de RE promove esse extravasamento permanece desconhecido (RON; WALTER, 2007). A apoptose é um processo conservado de morte celular programada, composto por um complexo ativado em cascata estreitamente sincronizado (FERRARI, D. et al., 2002; STRASSER; O'CONNOR; DIXIT, 2000), podendo ser engatilhado por diversos fatores com o objetivo de manter a homeostasia tecidual (MEIER; FINCH; EVAN, 2000; SIEGEL et al., 2003). A via intrínseca de apoptose mediada pela mitocôndria tem sido relacionada com a habilidade de Tat em induzir apoptose em diferentes tipos celulares, no entanto os eventos moleculares que antecedem essa ativação permanecem pouco elucidados (PERUZZI, 2006).

Uma vez estabelecida a capacidade da proteína Tat em induzir apoptose em células Jurkat, investigou-se a possível relação da via UPR neste processo através da análise de expressão relativa dos genes relacionados a esta via. Inicialmente investigou-se a expressão relativa do gene da chaperona BiP e observou-se um aumento na expressão relativa de BiP após 72 horas de estímulo com a proteína Tat. O aumento da expressão de BiP é um indicativo de estresse no RE, indicando a necessidade do aumento na capacidade de dobramento das proteínas dentro desta organela (WALTER; RON, 2011), sendo esta uma primeira evidência de que a exposição à proteína Tat é capaz de induzir estresse de RE com ativação da via UPR de maneira tempo-dependente. Além da observação do aumento na transcrição gênica da chaperona BiP, que pode ser causada pela ativação de diferentes elementos da via UPR, também foram analisadas as expressões relativa dos genes relacionados aos braços ATF6, PERK e IRE1 da via UPR. Observou-se que a proteína Tat foi capaz de induzir um aumento significativo na expressão relativa dos genes das três moléculas sensores do estresse: ATF6 (Figura 24), PERK (Figura 25) e IRE1 (Figura 26), sendo essas, evidências complementares de que a proteína Tat é capaz de gerar estresse de RE com consequente ativação da via UPR em células estimuladas, corroborando com as observações relatadas previamente (MA, R. et al., 2016). No entanto, sabe-se que os sensores ATF6, PERK e IRE1 são proteínas ancoradas na membrana do RE que identificam o estresse e sofrem ativação e rapidamente induzem uma resposta na tentativa de reestabelecer a homeostasia (KAUFMAN, 2002; SCHRODER, 2006; WALTER; RON, 2011). Dessa forma, a identificação do aumento da transcrição gênica dessas moléculas indica que a via UPR já sofreu ativação prévia, pois uma das características dessa ativação é a indução do aumento da transcrição dos genes relacionados a via UPR (YOSHIDA, 2007).

Os três braços da via UPR são ativados geralmente em resposta a qualquer estresse no RE; no entanto a ordem e o tempo de ativação de cada um deles pode variar (DUROSE; TAM; NIWA, 2006). Em geral, o estresse prolongado no RE leva a uma ativação sequencial dos braços IRE1, ATF6 e PERK, respectivamente, sendo que, essa ativação acontece de forma sequencial e pode implicar na indução de apoptose mediada pelo RE (LIN et al., 2007). Assim sendo, foram analisadas a expressão relativa dos genes induzidos por cada um dos braços da via UPR. O braço evolutivamente mais antigo da via UPR descrito é de

IRE1 que, durante o estresse, é ativado ao sofrer autofosforilação em resposta ao desligamento de BiP de sua porção intralumial (MORI, 2009). IRE1 apresenta um domínio endorribonuclease que promove o *splicing* alternativo catalisando a remoção de um *intron* de 26 nucleotídeos do mRNA do fator de transcrição XBP-1. A mudança na janela de leitura promovida por IRE1, ativa o fator XBP-1s que induz a expressão de diversos genes envolvidos em praticamente todos os aspectos da via UPR, enquanto a sua forma original ou *unspliced* age como repressor da expressão de tais genes (RON; WALTER, 2007).

A fim de verificar se o braço IRE1 da via UPR também sofreu ativação, foram analisadas as expressões relativas do fator de transcrição XBP-1 na sua forma *unspliced* - XBP1-u (Figura 29) e na sua forma *spliced* - XBP1-s (Figura 30). O aumento nos níveis de transcritos de XBP1-s observado logo nas primeiras 24 horas de estímulo com Tat, indicou que o braço IRE1 foi ativado. Provavelmente essa ativação ocorreu com o propósito de induzir a expressão das chaperonas BiP e dissulfeto isomerases na tentativa de aumentar a capacidade de dobramento de proteínas no RE. Em resposta à ativação de XBP1-s, observou-se o aumento nos níveis de mRNA de XBP1-u após 48 horas de estímulo, o que levou à gradativa diminuição nos níveis de XBP1-s observado nos tempos seguintes (48 e 72 horas), indicando assim, que possivelmente a molécula XBP1-u age como antagonista da expressão de XBP1-s. No entanto, após 72 horas de estímulo com Tat, os níveis de XBP1-u foram drasticamente reduzidos, enquanto os níveis de XBP1-s permaneceram elevados, sendo essa uma possível explicação para o aumento na expressão relativa de BiP ocorrer após 72 horas de estímulo. Esses dados em conjunto demonstram que ocorre ativação tempo-dependente do braço IRE1 da via UPR em células Jurkat estimuladas com Tat.

Subsequente à ativação de IRE1 durante o estresse de RE, ocorre a clivagem de proteína ATF6, sendo a porção clivada processada no complexo de Golgi e então direcionada ao núcleo onde pode atuar como fator de transcrição aumentando principalmente a expressão da chaperona BiP (HAZE et al., 1999). Observou-se que a expressão relativa do gene de ATF6 apenas apresenta um aumento significativo após 72 horas de estímulo (Figura 24); de forma semelhante, a chaperona BiP teve sua expressão relativa aumentada após 72 horas de estímulo. Isto sugere, que além da ação de XBP1-s sob o *locus* de BiP,

ATF6 também pode estar relacionada com a indução na expressão dessa chaperonas.

O terceiro braço da via UPR que teve sua ativação avaliada foi PERK, que de forma similar a IRE1, sofre auto fosforilação e homodimerização (YOSHIDA, 2007). PERK fosforila a subunidade alfa do fator de transcrição eIF2 α , resultado na atenuação global da tradução. No entanto, durante o estresse celular, moléculas de eIF2 α induzem os ribossomos a ligarem-se a ORF (do inglês, *open reading frame*) do mRNA de ATF4 e induzir a sua tradução (HARDING et al., 2000; MA, Y. et al., 2002). Com o intuito de investigar a possível ativação do braço de PERK em resposta ao estímulo com a proteína Tat, foram analisadas as expressões relativas dos genes induzidos por PERK: eIF2 α e ATF4. Observou-se um aumento na expressão relativa de eIF2 α (Figura 28) de forma tempo-dependente, apresentando mesmo perfil observado para os níveis de transcritos de PERK. A fosforilação de eIF2 α está relacionada com o aumento da expressão de ATF4 (HARDING et al., 2000) sendo que neste contexto observou-se o aumento nos níveis de transcritos de ATF4 (Figura 31). A ativação do braço PERK-eIF2 α -ATF4 acompanha o mesmo perfil de ativação de IRE1 e ATF6, evidenciando que Tat induz estresse de RE em células estimuladas e que a ativação dos três braços da via UPR acontecem de forma tempo-dependente. Esses dados em conjuntos corroboram um recente estudo, no qual demonstra-se que a expressão de Tat em astrócitos induz estresse de RE com consequente ativação da via UPR e essa ativação pode estar relacionada com a neurotoxicidade mediada por astrócitos (FAN; HE, 2016).

ATF4 é um fator de transcrição induzido pela fosforilação de eIF2 α , molécula responsável pela ativação de diversos genes pró-sobrevivência (HARDING et al., 2003). No entanto, em resposta ao prolongado estresse no RE, ATF4 é capaz de entrar no núcleo e induzir a expressão de CHOP (MA, Y. et al., 2002). O mecanismo preciso mediado por CHOP na indução e apoptose permanece desconhecido, porém sabe-se que CHOP altera o equilíbrio entre as moléculas anti e pró-apoptóticas (GHOSH et al., 2012). Uma vez determinada a ativação da via UPR em resposta ao estresse de RE gerado pela estimulação com Tat, foi avaliada a expressão relativa do gene pró-apoptótico CHOP. Semelhantemente ao perfil de expressão relativa de ATF4, observou-se que CHOP também apresentam aumento no nível de transcritos após 72 horas de estímulo com a proteína Tat (Figura 32). Sabendo que ATF4 é capaz de entrar no núcleo celular e induzir a transcrição da molécula

pró-apoptótica CHOP, é possível correlacionar o aumento da expressão relativa de CHOP com a apoptose induzida por Tat após 72 horas de estímulo. Além da indução de estresse no RE induzida por Tat, já foi relatado que a expressão da proteína viral gp120 também é capaz de induzir estresse de RE e aumentar os níveis de transcritos dos genes de BiP, XBP1-s e CHOP de maneira tempo-dependente (SHAH et al., 2016). Da mesma forma, foi relatada a indução de apoptose em astrócitos através da ativação da via IRE1-ASK-JNK-CHOP (SHAH et al., 2016). Além disso, foi observado que células HBMEC (do inglês, *human brain microvascular endothelial cells*) expostas a Tat apresentam ativação de vias pró-apoptóticas mediada pela via UPR, através do aumento de maneira tempo-dependente da molécula pró-apoptótica CHOP e o aumento atividade de caspase-12 relacionada diretamente com o RE (MA, R. et al., 2016). Ademais, o aumento na expressão de CHOP promove a parada no ciclo celular (BARONE et al., 1994). Com base nos dados apresentados, o aumento na expressão de CHOP (Figura 32) pode estar diretamente relacionado com a parada nas fases S e G2 no ciclo celular de células Jurkat estimuladas com Tat (Figura 14), sendo essa uma possível razão para a diminuição no número de células induzido pela proteína Tat (Figura 06).

A via induzida por CHOP é a principal reguladora de apoptose mediada pelo RE (ZINSZNER et al., 1998) e estimula a expressão de GADD34, ERO1 e DR5 (Receptor de morte 5). GADD34 atua no prolongamento do estresse no RE através da desfosforilação e ativação da molécula eIF2 α . Essa ativação resulta no reestabelecimento da tradução proteica e um aumento na quantidade de proteínas sendo sintetizadas no lúmen do RE. A reativação de eIF2 α e aumento da tradução proteica durante o estresse levam à morte celular causada em decorrência do acúmulo dessas proteínas desdobradas no interior do RE (LIU, N. et al., 2014). Sendo CHOP um indutor da expressão de GADD34, foi realizada a análise da expressão relativa do gene de GADD34. Observou-se que assim como ATF4 e CHOP, GADD34 também tem a sua expressão diminuída nas primeiras 24 horas de estímulo, sendo essa expressão reestabelecida aos níveis basais após 48 horas e apresenta um aumento significativo na sua expressão após 72 horas de estímulo com a proteína Tat.

Apesar de não se conhecer o mecanismo exato pelo qual CHOP induz apoptose, sabe-se que CHOP inibe a expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 e ativa a transcrição de diversos genes que

potencializam a apoptose, incluindo PUMA e BIM (GHOSH et al., 2012). Afim de avaliar se esse fenômeno ocorreu em células estimulada com Tat, além da análise da expressão de CHOP, foi analisada a expressão relativa dos genes de BIM e BCL-2. Foi observado ambas as moléculas, assim como CHOP, apresentam um aumento da expressão gênica relativa após 72 horas. Esperava-se que com a ativação de CHOP, a expressão de BCL-2 tivesse sido diminuída, no entanto o aumento dessa expressão corrobora um estudo prévio onde foi observado o aumento na expressão de BCL-2 em células Jurkat transfectadas com plasmídeo de Tat e em PBMCs estimuladas com a proteína extracelular (ZAULI et al., 1995). Assim como BCL-2, a molécula pró-apoptótica BIM também apresentou aumento na sua expressão gênica relativa. Foi previamente reportado que BIM atua na membrana do RE como molécula pró-apoptótica ao se ligar e inibir a BCL-2 anti-apoptótica e dessa forma é capaz de induzir apoptose (KIM, P. K. et al., 2004). Dessa forma, sugere-se que o aumento da expressão de BCL-2 pode ser um mecanismo compensatório, na tentativa de repor as proteínas anti-apoptóticas que estão sendo inibidas pela ação de BIM.

O destino pró-sobrevivência ou pró-apoptótico das células depende da extensão do estresse gerado, sendo a morte celular mediada pelo estresse de RE é principalmente atribuída aos braços IRE1 e PERK da via UPR (HETZ, 2012). Nesse sentido, a expressão de moléculas pró-apoptóticas como CHOP induzem a ativação da cascata das caspases, responsáveis pela morte celular durante o estresse (KIM, I.; XU; REED, 2008; YENKI; KHODAGHOLI; SHAERZADEH, 2013). A cascata de caspases é um mecanismo clássico de resposta pró-apoptótica em diversos tipos de células (MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013). A cascata pode ser ativada pela via extrínseca através do sinal de morte do receptor Fas, ou induzida pela via intrínseca, que pode estar associada tanto à mitocôndria quando ao estresse de RE (MCILWAIN et al., 2013). De maneira geral, a caspase-8 está associada à indução de apoptose através da via extrínseca, enquanto a caspase-9 está diretamente associada a via intrínseca mediada pela mitocôndria (FERRARO et al., 2003; SALVESEN; RENATUS, 2002). Em contrapartida, a via independente da mitocôndria é ativada em resposta ao prolongado estresse de RE, que tem a caspase-12 como a protease que inicia a cascata de ativação. A caspase-12 está localizada no citoplasma próxima ao RE, da mesma forma que outras caspases, apresenta-se em forma inativa e aparentemente é ativada apenas em

resposta ao estresse no RE (NAKAGAWA et al., 2000). Nesse contexto, foram avaliadas as atividades das caspases -3, -8 e -12 em células estimuladas com a proteína Tat, com o intuito de identificar a participação dessas proteases na apoptose induzida por Tat. Observou-se que em células Jurkat expostas à proteína Tat, há uma redução na atividade da caspase-8 (Figura 19), demonstrando que a via extrínseca não está relacionada com a apoptose induzida por Tat. Observou-se também um aumento na atividade tanto da caspase-12 (Figura 17) iniciadora da cascata que está estreitamente relacionada ao estresse de RE, bem como um aumento da atividade da caspase-3 (Figura 18), responsável diretamente pela via proteolítica de apoptose. A Caspase-12 está especificamente localizada na parte citoplasmática da membrana do RE, que é clivada em sua forma ativa durante estresse no RE (NAKAGAWA et al., 2000), podendo sua atividade estar relacionado com a liberação de cálcio do RE, sendo esse um possível vínculo entre a apoptose mediada pelo RE e apoptose induzida pela mitocôndria.

Além do vínculo entre RE e mitocôndria estabelecido através da caspase-12, acredita-se que o efluxo de Ca^{2+} possa ser um outro importante fator na indução de apoptose mediada pelo estresse. Durante o estresse de RE, que é causado principalmente pelo acúmulo de proteínas desdobradas, ocorre uma perturbação no gradiente de concentração de íons no interior do RE, alterando o equilíbrio osmótico e resultando no extravasamento para o citoplasma e depleção nos níveis de Ca^{2+} (MORI, 2000; PATIL; WALTER, 2001). A depleção de Ca^{2+} no lúmen do RE inibe o dobramento de proteínas acelerando o seu acúmulo e potencializando a ativação da via UPR (KIM, R. et al., 2006; MA, Y. et al., 2002). O Ca^{2+} citoplasmático liberado pelo RE é rapidamente absorvido pela membrana das mitocôndrias, essa absorção resulta em alterações iônica que geram a produção de ROS, contribuindo para o aumento do estresse oxidativo e a indução de apoptose mediada pela via UPR (ROMANI et al., 2010; YOSHIDA, 2007). Tem sido demonstrado que a proteína Tat é capaz de induzir o extravasamento de Ca^{2+} do lúmen do RE com consequente disfunção mitocondrial (HAUGHEY et al., 1999; NORMAN et al., 2008). Neste contexto, após ter sido identificada a ativação da via UPR, através do aumento da expressão relativa dos genes envolvidos nessa via, investigou-se a possível relação entre ativação da via UPR com a disfunção mitocondrial através da análise de despolarização de membrana de mitocôndria. Observou-se que há um aumento

significativo no número de células que perderam o potencial de membrana mitocondrial quando estimuladas com a proteína Tat durante 72 horas. Sabendo que perturbações no potencial de membrana mitocondrial são capazes de induzir a morte celular (RANGA et al., 2004; SIDDAPPA et al., 2006) presumiu-se que os 73,8% das células Jurkat estimuladas com a proteína Tat que perderam o potencial de membrana mitocondrial (Figura 21), poderão entrar em processo de apoptose de maneira tempo-dependente se esse fenômeno não for revertido. Assim, a frequência média de 12% de células apoptóticas observada após 72 horas de estímulo (Figura 14), poderia ser maior se o estímulo permanecesse por um período mais prolongado.

Em conjuntos, os dados obtidos com este trabalho reforçam as evidências de que a proteína Tat é capaz de estimular células alvo através do efeito *bystander* induzindo uma ativação celular gerando estresse de RE com conseqüente ativação da via UPR e indução de apoptose. Com as evidências observadas foi possível determinar uma possível via de ativação de apoptose induzida por Tat mediada pela via UPR, conforme descrito na Figura 36.

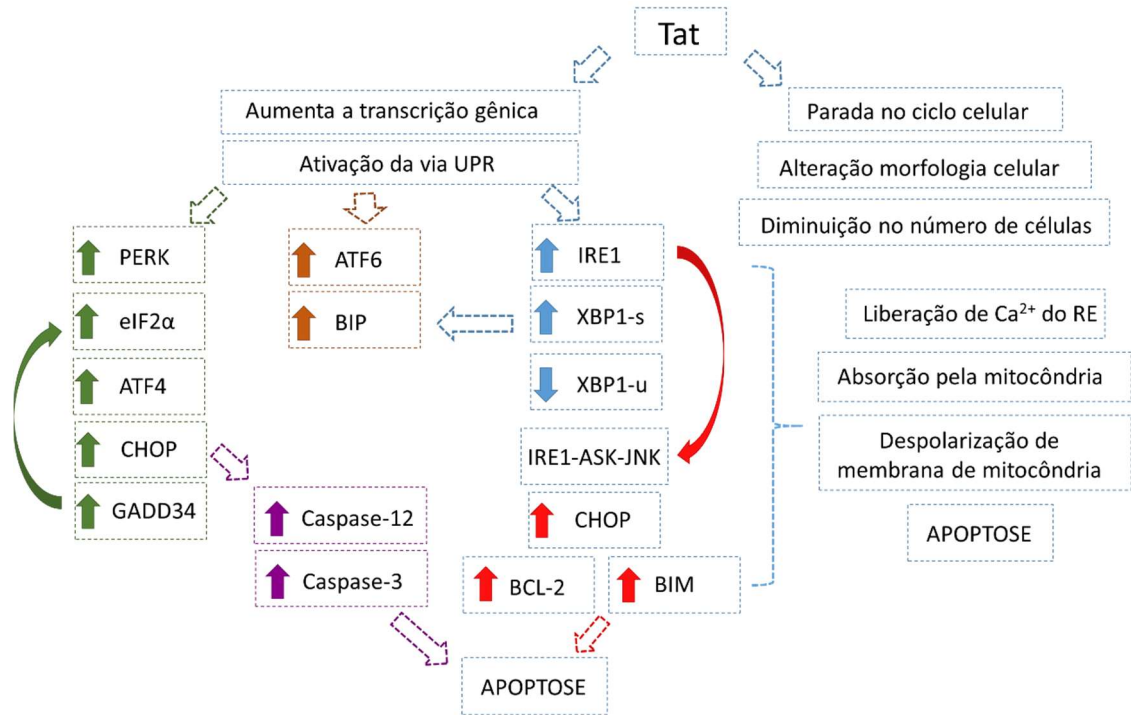


Figura 36. Mecanismo de ação proposto com base nos resultados obtidos. A proteína Tat atua aumentando a transcrição de diversos genes celulares que culmina num aumento na carga de proteínas a serem dobradas no RE, gerando assim estresse de RE com conseqüente ativação dos três braços da via UPR (PERK, ATF6 e IRE1). PERK tem sua expressão aumentada,

induzindo a fosforilação de eIF2 α gerando uma atenuação global da síntese protéica na tentativa de reduzir a quantidade de proteínas a serem dobradas no RE; no entanto induz seletivamente o aumento da tradução de ATF4. ATF4 atua como fator de transcrição induzindo a expressão de CHOP, que irá induzir a transcrição de GADD34. GADD34 por sua vez induz a reativação de eIF2 α reestabelecendo a tradução protéica e promovendo aumento do estresse no RE. O aumento na expressão de CHOP induz ativação da caspase-12 iniciadora que está relacionada à membrana do RE que por sua vez induz ativação da caspase-3 diretamente responsável pela morte celular. O braço de ATF6 induz o *splicing* alternativo da molécula XBP-1, dessa forma aumentando a expressão de XBP1-s e diminuindo a expressão de XBP1-u. No braço de IRE1, a molécula XBP1-s é processada e direcionada para o núcleo onde induz a expressão da chaperona BiP. IRE1 também pode formar um complexo com as proteínas ASK e JNK, atuando na indução da transcrição de CHOP que atuará desregulando o equilíbrio entre as moléculas pró e anti-apoptóticas (BIM e BCL2) e dessa forma induzindo a ativação de apoptose. Além disso, CHOP também pode estar envolvido na parada do ciclo celular em células estimuladas com a proteína Tat. A parada nas fases S e G2 do ciclo celular promovem alterações celulares como o aumento do tamanho e da complexidade intracelular, bem como provocam a diminuição na proliferação celular. Durante o estresse de RE observado através da ativação da via UPR, o acúmulo de proteínas induz o extravasamento de Ca²⁺ da membrana do RE, sendo o Ca²⁺ citoplasmático captado pela mitocôndria e induzindo assim despolarização de membrana de mitocôndria, que induzirá a apoptose através da liberação de citocromo C e ativação das caspases -12 e -3.

7 SUMÁRIO DE RESULTADOS

- Observou-se que a proteína Tat foi capaz de induzir apoptose em células Jurkat após 72 horas de estímulo na concentração de 200 nM;
- Identificou-se que a proteína Tat diminui significativamente a proliferação celular através da parada nas fases S e G2 do ciclo celular de células Jurkat estimuladas;
- Observou-se que Tat induz alterações morfológicas observadas na microscopia de fluorescência de células marcadas com DAPI, bem como demonstrou deslocamento da mediana das populações celulares analisadas por citometria de fluxo, indicando um aumento do tamanho e complexidade intracelular de células estimuladas com Tat;
- Observou-se que a morte celular induzida por Tat foi mediada pela ativação das caspases-12, iniciadora associada ao RE e da caspase-3 executora de apoptose, no entanto a caspase-8, da via extrínseca de apoptose, parece não ter participação nessa morte celular induzida por Tat;
- Observou-se que a proteína Tat foi capaz de induzir despolarização de membrana de mitocôndrias de células estimuladas, sendo esse um indicativo de indução de morte celular tempo-dependente;
- A proteína Tat foi capaz de induzir estresse de RE com consequente ativação da via UPR de maneira tempo-dependente;
- A ativação da via UPR induzida por Tat, ativa a transcrição de genes pró-apoptóticos que culminam na ativação da apoptose observada.

8 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo investigou a capacidade da proteína Tat em induzir apoptose em células Jurkat e correlacionou a morte celular com a ativação da via UPR. Os resultados obtidos corroboram estudos prévios que determinaram a capacidade da proteína Tat em induzir apoptose em células Jurkat e confirma a hipótese de que essa morte celular está relacionada à ativação da via UPR. Acredita-se que essa ação da proteína Tat constitui um dos principais mecanismos de depleção dos linfócitos T CD4+, conduzindo à evolução da patogênese do HIV. Nesse sentido, observou-se que a estimulação com 200 nM de proteína Tat foi capaz de induzir apoptose em células Jurkat após 72 horas de estímulo, bem como, observou-se que a ativação dos três braços da via UPR (PERK, ATF6 e IRE1) de forma tempo dependente e levando à indução da expressão dos genes pró-apoptóticos CHOP, GADD34 e BIM. A ativação de apoptose observada está relacionada com a atividade das caspases -3 e -12, bem como, há uma estreita relação entre a ativação da via UPR e a despolarização de membrana de mitocôndria. Além de causar apoptose, observou-se que a proteína Tat causa uma parada nas fases S e G2 do ciclo celular com consequente alterações morfológicas, inibindo a proliferação celular que juntamente com a indução de apoptose resultam em uma significativa redução no número células. A identificação do papel de Tat no estresse no RE com posterior indução apoptótica podem reforçar a sugestão da via UPR como um possível alvo para terapia antirretroviral.

9 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, surgem alguns pontos a serem esclarecidos e aprofundados e que constituem os objetivos dos próximos passos dessa pesquisa:

- Análise de expressão das proteínas relacionadas com ativação da via UPR e indução de apoptose através de Western Blot;
- Ensaios de silenciamento gênico de CHOP para determinar a participação desse fator pró-apoptótico relacionado a via UPR na indução de apoptose induzida por Tat;
- Determinação da capacidade da proteína Tat em induzir apoptose em células humanas primárias PBMCs (do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*).

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSE, R. L.; MACKENZIE, J. M. West Nile virus differentially modulates the unfolded protein response to facilitate replication and immune evasion. **J Virol**, v. 85, n. 6, p. 2723-32, Mar 2011.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res**, v. 64, n. 15, p. 5245-50, Aug 2004.

ASIOLI, S. et al. Expression of p63 is the sole independent marker of aggressiveness in localised (stage I-II) Merkel cell carcinomas. **Mod Pathol**, v. 24, n. 11, p. 1451-61, Nov 2011.

ASSELAH, T. et al. In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C. **J Pathol**, v. 221, n. 3, p. 264-74, Jul 2010.

AYAUB, E. A. et al. GRP78 and CHOP modulate macrophage apoptosis and the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **J Pathol**, v. 239, n. 4, p. 411-25, Aug 2016.

BACHANI, M. et al. Detection of anti-tat antibodies in CSF of individuals with HIV-associated neurocognitive disorders. **J Neurovirol**, v. 19, n. 1, p. 82-8, Feb 2013.

BARONE, M. V. et al. CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. **Genes Dev**, v. 8, n. 4, p. 453-64, Feb 1994.

BELLINO, S. et al. The presence of anti-Tat antibodies in HIV-infected individuals is associated with containment of CD4+ T-cell decay and viral load, and with delay of disease progression: results of a 3-year cohort study. **Retrovirology**, v. 11, p. 49, Jun 2014.

BORSA, M. et al. HIV infection and antiretroviral therapy lead to unfolded protein response activation. **Virologia**, v. 12, p. 77, May 2015.

BOYCE, M. et al. A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. **Science**, v. 307, n. 5711, p. 935-9, Feb 2005.

BUONAGURO, L. et al. Heteroduplex mobility assay and phylogenetic analysis of V3 region sequences of human immunodeficiency virus type 1 isolates from Gulu, northern Uganda. The Italian-Ugandan Cooperation AIDS Program. **J Virol**, v. 69, n. 12, p. 7971-81, Dec 1995.

CAMPBELL, G. R.; LORET, E. P. What does the structure-function relationship of the HIV-1 Tat protein teach us about developing an AIDS vaccine? **Retrovirology**, v. 6, p. 50, May 2009.

CAMPBELL, G. R.; LORET, E. P.; SPECTOR, S. A. HIV-1 clade B Tat, but not clade C Tat, increases X4 HIV-1 entry into resting but not activated CD4⁺ T cells. **J Biol Chem**, v. 285, n. 3, p. 1681-91, Jan 2010.

CAMPBELL, G. R. et al. Tat mutations in an African cohort that do not prevent transactivation but change its immunogenic properties. **Vaccine**, v. 25, n. 50, p. 8441-7, Dec 2007.

CASELLI, E. et al. Short communication: activating transcription factor 4 (ATF4) promotes HIV type 1 activation. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 28, n. 8, p. 907-12, Aug 2012.

CHEN, G. et al. Brain-derived neurotrophic factor suppresses tunicamycin-induced upregulation of CHOP in neurons. **J Neurosci Res**, v. 85, n. 8, p. 1674-84, Jun 2007.

CHEN, N. Y. et al. HIV-1 capsid is involved in post-nuclear entry steps. **Retrovirology**, v. 13, p. 28, Apr 2016.

CHEN, Q. et al. Characterization of Tat antibody responses in Chinese individuals infected with HIV-1. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60825, 2013.

COSTA, C. Z.; DA ROSA, S. E.; DE CAMARGO, M. M. The unfolded protein response: how protein folding became a restrictive aspect for innate immunity and B lymphocytes. **Scand J Immunol**, v. 73, n. 5, p. 436-48, May 2011.

CUMMINS, N. W.; BADLEY, A. D. Mechanisms of HIV-associated lymphocyte apoptosis: 2010. **Cell Death Dis**, v. 1, p. e99, Nov 2010.

CZABOTAR, P. E. et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 15, n. 1, p. 49-63, Jan 2014.

DICKENS, L. S. et al. The 'complexities' of life and death: death receptor signalling platforms. **Exp Cell Res**, v. 318, n. 11, p. 1269-77, Jul 2012.

DUROSE, J. B.; TAM, A. B.; NIWA, M. Intrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alternate forms of endoplasmic reticulum stress. **Mol Biol Cell**, v. 17, n. 7, p. 3095-107, Jul 2006.

EMERMAN, M.; MALIM, M. H. HIV-1 regulatory/accessory genes: keys to unraveling viral and host cell biology. **Science**, v. 280, n. 5371, p. 1880-4, Jun 1998.

ENSOLI, B. et al. Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. **Nature**, v. 345, n. 6270, p. 84-6, May 1990.

FAN, Y.; HE, J. J. HIV-1 Tat Induces Unfolded Protein Response and Endoplasmic Reticulum Stress in Astrocytes and Causes Neurotoxicity through Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) Activation and Aggregation. **J Biol Chem**, v. 291, n. 43, p. 22819-22829, Oct 2016.

FAUCI, A. S. Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. **Nature**, v. 384, n. 6609, p. 529-34, Dec 1996.

- FERRARI, A. et al. Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. **Mol Ther**, v. 8, n. 2, p. 284-94, Aug 2003.
- FERRARI, D. et al. Endoplasmic reticulum, Bcl-2 and Ca²⁺ handling in apoptosis. **Cell Calcium**, v. 32, n. 5-6, p. 413-20, Nov-Dec 2002.
- FERRARO, E.; CORVARO, M.; CECCONI, F. Physiological and pathological roles of Apaf1 and the apoptosome. **J Cell Mol Med**, v. 7, n. 1, p. 21-34, Jan-Mar 2003.
- FINKEL, T. H. et al. Apoptosis occurs predominantly in bystander cells and not in productively infected cells of HIV- and SIV-infected lymph nodes. **Nat Med**, v. 1, n. 2, p. 129-34, Feb 1995.
- FISHER, A. G. et al. Infectious mutants of HTLV-III with changes in the 3' region and markedly reduced cytopathic effects. **Science**, v. 233, n. 4764, p. 655-9, Aug 1986.
- FRANKEL, A. D.; PABO, C. O. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. **Cell**, v. 55, n. 6, p. 1189-93, Dec 1988.
- FU, J. et al. Expression of markers of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the placenta of women with early and late onset severe pre-eclampsia. **Taiwan J Obstet Gynecol**, v. 54, n. 1, p. 19-23, Feb 2015.
- FURIA, L.; PELICCI, P.; FARETTA, M. High-resolution cytometry for high-content cell cycle analysis. **Curr Protoc Cytom**, v. 70, p. 7 41 1-15, Oct 2014.
- GALEHDAR, Z. et al. Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. **J Neurosci**, v. 30, n. 50, p. 16938-48, Dec 2010.

GALLUZZI, L. et al. Independent transcriptional reprogramming and apoptosis induction by cisplatin. **Cell Cycle**, v. 11, n. 18, p. 3472-80, Sep 2012.

GANAPATHY-KANNIAPPAN, S. et al. 3-Bromopyruvate induces endoplasmic reticulum stress, overcomes autophagy and causes apoptosis in human HCC cell lines. **Anticancer Res**, v. 30, n. 3, p. 923-35, Mar 2010.

GANDHI, N. et al. Differential effects of HIV type 1 clade B and clade C Tat protein on expression of proinflammatory and antiinflammatory cytokines by primary monocytes. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 25, n. 7, p. 691-9, Jul 2009.

GASS, J. N.; GIFFORD, N. M.; BREWER, J. W. Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. **J Biol Chem**, v. 277, n. 50, p. 49047-54, Dec 2002.

GHAFOURI, M. et al. HIV-1 associated dementia: symptoms and causes. **Retrovirology**, v. 3, p. 28, May 2006.

GHOSH, A. P. et al. CHOP potentially co-operates with FOXO3a in neuronal cells to regulate PUMA and BIM expression in response to ER stress. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e39586, 2012.

GIRARD, M. P. et al. Human immunodeficiency virus (HIV) immunopathogenesis and vaccine development: a review. **Vaccine**, v. 29, n. 37, p. 6191-218, Aug 2011.

GRAF, T.; PINTO, A. R. The increasing prevalence of HIV-1 subtype C in Southern Brazil and its dispersion through the continent. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 170-8, Jan 2013.

GROENENDYK, J.; MICHALAK, M. Endoplasmic reticulum quality control and apoptosis. **Acta Biochim Pol**, v. 52, n. 2, p. 381-95, 2005.

HARDING, H. P. et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. **Mol Cell**, v. 6, n. 5, p. 1099-108, Nov 2000.

HARDING, H. P. et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. **Mol Cell**, v. 11, n. 3, p. 619-33, Mar 2003.

HAUGHEY, N. J. et al. Involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate-regulated stores of intracellular calcium in calcium dysregulation and neuron cell death caused by HIV-1 protein tat. **J Neurochem**, v. 73, n. 4, p. 1363-74, Oct 1999.

HAZE, K. et al. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. **Mol Biol Cell**, v. 10, n. 11, p. 3787-99, Nov 1999.

HENDERSHOT, L. et al. Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative BiP ATPase mutants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 11, p. 5269-74, May 1996.

HETZ, C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 2, p. 89-102, Jan 2012.

HIRAMATSU, N.; JOSEPH, V. T.; LIN, J. H. Monitoring and manipulating mammalian unfolded protein response. **Methods Enzymol**, v. 491, p. 183-98, 2011.

HO, D. D. et al. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. **Nature**, v. 373, n. 6510, p. 123-6, Jan 1995.

INAGEDA, K. Insulin modulates induction of glucose-regulated protein 78 during endoplasmic reticulum stress via augmentation of ATF4 expression in human neuroblastoma cells. **FEBS Lett**, v. 584, n. 16, p. 3649-54, Aug 2010.

JHENG, J. R. et al. Endoplasmic reticulum stress is induced and modulated by enterovirus 71. **Cell Microbiol**, v. 12, n. 6, p. 796-813, Jun 2010.

JL, F. J. et al. Dihydromyricetin induces cell apoptosis via a p53-related pathway in AGS human gastric cancer cells. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 4, p. 15564-71, Dec 2015.

JU, S. M. et al. Extracellular HIV-1 Tat up-regulates expression of matrix metalloproteinase-9 via a MAPK-NF-kappaB dependent pathway in human astrocytes. **Exp Mol Med**, v. 41, n. 2, p. 86-93, Feb 2009.

KAUFMAN, R. J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. **J Clin Invest**, v. 110, n. 10, p. 1389-98, Nov 2002.

KEPP, O. et al. Viral subversion of immunogenic cell death. **Cell Cycle**, v. 8, n. 6, p. 860-9, Mar 2009.

KIM, I.; XU, W.; REED, J. C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 12, p. 1013-30, Dec 2008.

KIM, P. K. et al. During apoptosis bcl-2 changes membrane topology at both the endoplasmic reticulum and mitochondria. **Mol Cell**, v. 14, n. 4, p. 523-9, May 2004.

KIM, R. et al. Role of the unfolded protein response in cell death. **Apoptosis**, v. 11, n. 1, p. 5-13, Jan 2006.

LAMONT, C. et al. Characterization of endogenous and recombinant proviral elements of a highly tumorigenic AKR cell line. **J Virol**, v. 65, n. 9, p. 4619-28, Sep 1991.

LENIN, R. et al. Altered immunometabolism at the interface of increased endoplasmic reticulum (ER) stress in patients with type 2 diabetes. **J Leukoc Biol**, v. 98, n. 4, p. 615-22, Oct 2015.

LI, C. J. et al. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. **Science**, v. 268, n. 5209, p. 429-31, Apr 1995.

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. **J Biol Chem**, v. 281, n. 11, p. 7260-70, Mar 2006.

LI, J. C. et al. Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response. **FEBS Lett**, v. 579, n. 14, p. 3055-62, Jun 2005.

LIAO, W. et al. Combined metabolomic and quantitative real-time PCR analyses reveal systems metabolic changes in Jurkat T-cells treated with HIV-1 Tat protein. **J Proteome Res**, v. 11, n. 11, p. 5109-23, Nov 2012.

LIN, J. H. et al. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. **Science**, v. 318, n. 5852, p. 944-9, Nov 2007.

LIU, M. et al. Modulation of Eg5 activity contributes to mitotic spindle checkpoint activation and Tat-mediated apoptosis in CD4-positive T-lymphocytes. **J Pathol**, v. 233, n. 2, p. 138-47, Jun 2014.

LIU, N. et al. Calcium channel blocker verapamil accelerates gambogic acid-induced cytotoxicity via enhancing proteasome inhibition and ROS generation. **Toxicol In Vitro**, v. 28, n. 3, p. 419-25, Apr 2014.

LIU, Y. et al. Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. **Nat Med**, v. 6, n. 12, p. 1380-7, Dec 2000.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. **Br J Cancer**, v. 112, n. 6, p. 957-62, Mar 2015.

LORET, E. P. et al. Circular dichroism and molecular modeling yield a structure for the complex of human immunodeficiency virus type 1 trans-activation response RNA and the binding region of Tat, the trans-acting transcriptional activator. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 20, p. 9734-8, Oct 1992.

MA, R. et al. HIV Tat-Mediated Induction of Human Brain Microvascular Endothelial Cell Apoptosis Involves Endoplasmic Reticulum Stress and Mitochondrial Dysfunction. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 1, p. 132-42, Jan 2016.

MA, Y. et al. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. **J Mol Biol**, v. 318, n. 5, p. 1351-65, May 2002.

MAHLKNECHT, U. et al. NF-kappaB-dependent control of HIV-1 transcription by the second coding exon of Tat in T cells. **J Leukoc Biol**, v. 83, n. 3, p. 718-27, Mar 2008.

MANN, D. A.; FRANKEL, A. D. Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. **EMBO J**, v. 10, n. 7, p. 1733-9, Jul 1991.

MARINO, D. et al. APOBEC4 Enhances the Replication of HIV-1. **PLoS One**, v. 11, n. 6, p. e0155422, 2016.

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. **J Biol Chem**, v. 280, n. 25, p. 23829-36, Jun 24 2005.

MCCULLOUGH, K. D. et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 4, p. 1249-59, Feb 2001.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 5, n. 4, p. a008656, Apr 2013.

MCMILLAN, N. A. et al. HIV-1 Tat directly interacts with the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent kinase, PKR. **Virology**, v. 213, n. 2, p. 413-24, Nov 1995.

MEDIOUNI, S. et al. HIV-1 infected patients have antibodies recognizing folded Tat. **Infect Disord Drug Targets**, v. 11, n. 1, p. 57-63, Feb 2011.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 796-801, Oct 2000.

MORI, K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. **Cell**, v. 101, n. 5, p. 451-4, May 2000.

MORI, K. Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. **J Biochem**, v. 146, n. 6, p. 743-50, Dec 2009.

MOUS, K. et al. Expression analysis of LEDGF/p75, APOBEC3G, TRIM5alpha, and tetherin in a Senegalese cohort of HIV-1-exposed seronegative individuals. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33934, 2012.

NAKAGAWA, T.; YUAN, J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. **J Cell Biol**, v. 150, n. 4, p. 887-94, Aug 2000.

NAKAGAWA, T. et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 98-103, Jan 2000.

NARDELLI, B. et al. CD4⁺ blood lymphocytes are rapidly killed in vitro by contact with autologous human immunodeficiency virus-infected cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 92, n. 16, p. 7312-6, Aug 1995.

NEKHAI, S. et al. Regulation of HIV-1 transcription by protein phosphatase 1. **Curr HIV Res**, v. 5, n. 1, p. 3-9, Jan 2007.

NIEMI, N. M.; MACKEIGAN, J. P. Mitochondrial phosphorylation in apoptosis: flipping the death switch. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, n. 6, p. 572-82, Aug 2013.

NORMAN, J. P. et al. HIV-1 Tat activates neuronal ryanodine receptors with rapid induction of the unfolded protein response and mitochondrial hyperpolarization. **PLoS One**, v. 3, n. 11, p. e3731, 2008.

OYADOMARI, S.; MORI, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. **Cell Death Differ**, v. 11, n. 4, p. 381-9, Apr 2004.

PASQUAL, G. et al. Role of the host cell's unfolded protein response in arenavirus infection. **J Virol**, v. 85, n. 4, p. 1662-70, Feb 2011.

PATIL, C.; WALTER, P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. **Curr Opin Cell Biol**, v. 13, n. 3, p. 349-55, Jun 2001.

PERUZZI, F. The multiple functions of HIV-1 Tat: proliferation versus apoptosis. **Front Biosci**, v. 11, p. 708-17, Jan 01 2006.

PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnol Lett**, v. 26, n. 6, p. 509-15, Mar 2004.

PUGLIESE, A. et al. A review of HIV-1 Tat protein biological effects. **Cell Biochem Funct**, v. 23, n. 4, p. 223-7, Jul-Aug 2005.

RAMBAUT, A. et al. The causes and consequences of HIV evolution. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 1, p. 52-61, Jan 2004.

RANGA, U. et al. Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 subtype C strains is a defective chemokine. **J Virol**, v. 78, n. 5, p. 2586-90, Mar 2004.

RICHMAN, D. D. et al. The challenge of finding a cure for HIV infection. **Science**, v. 323, n. 5919, p. 1304-7, Mar 2009.

ROHR, O. et al. Regulation of HIV-1 gene transcription: from lymphocytes to microglial cells. **J Leukoc Biol**, v. 74, n. 5, p. 736-49, Nov 2003.

ROMANI, B.; ENGELBRECHT, S.; GLASHOFF, R. H. Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. **J Gen Virol**, v. 91, n. Pt 1, p. 1-12, Jan 2010.

RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 7, p. 519-29, Jul 2007.

RUDDOCK, L. W.; MOLINARI, M. N-glycan processing in ER quality control. **J Cell Sci**, v. 119, n. Pt 21, p. 4373-80, Nov 2006.

RUIZ, A. P.; PRASAD, V. R. Measuring the Uptake and Transactivation Function of HIV-1 Tat Protein in a Trans-cellular Cocultivation Setup. **Methods Mol Biol**, v. 1354, p. 353-66, 2016.

RUTKOWSKI, D. T.; KAUFMAN, R. J. A trip to the ER: coping with stress. **Trends Cell Biol**, v. 14, n. 1, p. 20-8, Jan 2004.

SALVESEN, G. S.; RENATUS, M. Apoptosome: the seven-spoked death machine. **Dev Cell**, v. 2, n. 3, p. 256-7, Mar 2002.

SANO, R.; REED, J. C. ER stress-induced cell death mechanisms. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 12, p. 3460-70, Dec 2013.

SCHRODER, M. The unfolded protein response. **Mol Biotechnol**, v. 34, n. 2, p. 279-90, Oct 2006.

SCHRODER, M. Endoplasmic reticulum stress responses. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 6, p. 862-94, Mar 2008.

SCHRODER, M.; KAUFMAN, R. J. Divergent roles of IRE1alpha and PERK in the unfolded protein response. **Curr Mol Med**, v. 6, n. 1, p. 5-36, Feb 2006.

SCHWARZE, S. R. et al. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. **Science**, v. 285, n. 5433, p. 1569-72, Sep 1999.

SCORRANO, L. et al. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. **Science**, v. 300, n. 5616, p. 135-9, Apr 2003.

SHAH, A. et al. HIV-1 gp120 induces type-1 programmed cell death through ER stress employing IRE1alpha, JNK and AP-1 pathway. **Sci Rep**, v. 6, p. 18929, Jan 2016.

SIDDAPPA, N. B. et al. Transactivation and signaling functions of Tat are not correlated: biological and immunological characterization of HIV-1 subtype-C Tat protein. **Retrovirology**, v. 3, p. 53, Aug 18 2006.

SIEGEL, R. M. et al. Death receptor signaling and autoimmunity. **Immunol Res**, v. 27, n. 2-3, p. 499-512, 2003.

SIGNORET, N. et al. Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. **J Cell Biol**, v. 139, n. 3, p. 651-64, Nov 1997.

SOBHIAN, B. et al. HIV-1 Tat assembles a multifunctional transcription elongation complex and stably associates with the 7SK snRNP. **Mol Cell**, v. 38, n. 3, p. 439-51, May 2010.

SOURANI, Z. M. et al. Gallic Acid Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Lymphoblastic Leukemia Cell Line (C121). **Iran J Med Sci**, v. 41, n. 6, p. 525-530, Nov 2016.

STEINAU, M.; RAJEEVAN, M. S.; UNGER, E. R. DNA and RNA references for qRT-PCR assays in exfoliated cervical cells. **J Mol Diagn**, v. 8, n. 1, p. 113-8, Feb 2006.

STETTNER, M. R. et al. SMAD proteins of oligodendroglial cells regulate transcription of JC virus early and late genes coordinately with the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. **J Gen Virol**, v. 90, n. Pt 8, p. 2005-14, Aug 2009.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annu Rev Biochem**, v. 69, p. 217-45, 2000.

TAHIROV, T. H. et al. Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. **Nature**, v. 465, n. 7299, p. 747-51, Jun 2010.

TRAVERS, K. J. et al. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. **Cell**, v. 101, n. 3, p. 249-58, Apr 2000.

TYAGI, M. et al. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. **J Biol Chem**, v. 276, n. 5, p. 3254-61, Feb 02 2001.

UPTON, J. P. et al. Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stress. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 12, p. 3943-51, Jun 2008.

URANO, F. et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. **Science**, v. 287, n. 5453, p. 664-6, Jan 2000.

VAN BAALEN, C. A. et al. Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific cytotoxic T lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS. **J Gen Virol**, v. 78 (Pt 8), p. 1913-8, Aug 1997.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 2002.

VIVES, E. Cellular uptake [correction of utake] of the Tat peptide: an endocytosis mechanism following ionic interactions. **J Mol Recognit**, v. 16, n. 5, p. 265-71, Sep-Oct 2003.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, v. 334, n. 6059, p. 1081-6, Nov 2011.

WATANABE, D. et al. Molecular cloning of a novel Ca(2+)-binding protein (calmegin) specifically expressed during male meiotic germ cell development. **J Biol Chem**, v. 269, n. 10, p. 7744-9, Mar 1994.

WESTENDORP, M. O. et al. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. **Nature**, v. 375, n. 6531, p. 497-500, Jun 1995.

XIAO, H. et al. Selective CXCR4 antagonism by Tat: implications for in vivo expansion of coreceptor use by HIV-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 21, p. 11466-71, Oct 2000.

YENKI, P.; KHODAGHOLI, F.; SHAERZADEH, F. Inhibition of phosphorylation of JNK suppresses Abeta-induced ER stress and upregulates prosurvival mitochondrial proteins in rat hippocampus. **J Mol Neurosci**, v. 49, n. 2, p. 262-9, Feb 2013.

YOSHIDA, H. ER stress and diseases. **FEBS J**, v. 274, n. 3, p. 630-58, Feb 2007.

ZAULI, G.; GIBELLINI, D. The human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Tat protein and Bcl-2 gene expression. **Leuk Lymphoma**, v. 23, n. 5-6, p. 551-60, Nov 1996.

ZAULI, G. et al. The human immunodeficiency virus type-1 Tat protein upregulates Bcl-2 gene expression in Jurkat T-cell lines and primary peripheral blood mononuclear cells. **Blood**, v. 86, n. 10, p. 3823-34, Nov 15 1995.

ZHANG, C. et al. Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 289, n. 3, p. 718-24, Dec 2001.

ZHENG, L. et al. Extracellular HIV Tat and Tat cysteine rich peptide increase CCR5 expression in monocytes. **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 6, n. 7, p. 668-72, Jul 2005.

ZINSZNER, H. et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. **Genes Dev**, v. 12, n. 7, p. 982-95, Apr 1998.

ZONG, W. X. et al. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. **J Cell Biol**, v. 162, n. 1, p. 59-69, Jul 2003.

11 MATERIAL SUPLEMENTAR

11.1 Padronização das condições ideais de cultura das células Jurkat

Procedeu-se, então, à padronização das condições de cultivo, onde os fatores levados em consideração foram: número inicial de células por poço, tamanho da placa e concentração de diferentes componentes do meio de cultura, como HEPES, bicarbonato de sódio e SBF. Com o intuito de otimizar os reagentes, determinou-se que 2 ml de RPMI 1640 seria o volume ideal para a realização dos experimentos, bem como optou-se por manter a concentração de 2 mM de L-glutamina, conforme sugerido na ficha técnica da linhagem celular. Cada variável foi avaliada através de alterações na viabilidade celular após 72 horas de cultivo através da contagem em câmara de Neubauer com o corante azul de tripan 0,2%.

11.1.1 Padronização do número inicial de célula

Com o propósito de determinar qual seria o número inicial de células mais adequado, foram testadas três diferentes concentrações: 2×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 células por poço na placa de 24 poços. Observou-se que a melhor concentração inicial de células é 2×10^5 , pois a viabilidade média obtida após 72 horas de incubação foi 91,27% ($\pm 1,05$), enquanto o plaqueamento inicial de 5×10^5 e 1×10^6 , apresentam viabilidade respectivamente 70,67% ($\pm 0,87$) e 16,83 ($\pm 3,65$) (Figura 05). Dessa forma, determinou-se que a concentração de células ideal para o plaqueamento inicial seria 2×10^5 células.

Viabilidade de células Jurkat após 72 horas de incubação

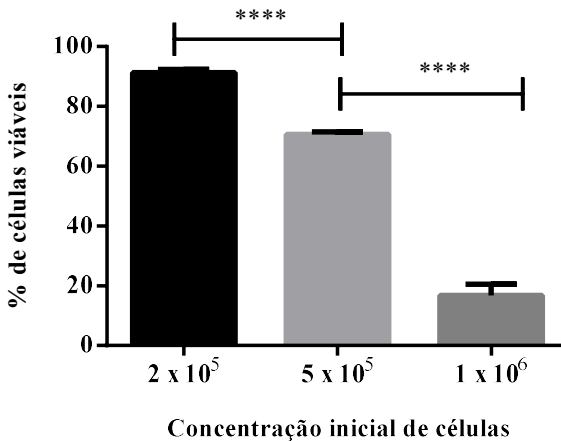


Figura S01. Viabilidade de células Jurkat após 72 de incubação. Avaliação da porcentagem de células viáveis após 72 horas de incubação com plaqueamento inicial de diferentes densidades celulares, 2×10^5 , 5×10^5 ou 1×10^6 . A diferença significativa foi observada através de uma comparação múltipla onde (****) $p < 0,00001$.

11.1.2 Padronização das concentrações de bicarbonato de sódio e HEPES

Após a determinação do número ideal de células, a segunda variável a ser analisada foi o tamponamento do meio de cultura, que é essencial para manter o equilíbrio osmótico e garantir que as células mantenham um crescimento estável sem induzir estresse celular pela acidificação do meio. Foram testadas duas concentrações de bicarbonato de sódio, 1,5 g/L e 2,0 g/L e foi observada que a viabilidade celular se manteve em 94,11% e 95,15% após 72 horas de incubação. Visto que a viabilidade celular não sofre influência da concentração de bicarbonato, determinou-se que 2,0 g/L seria a condição ideal.

Além da concentração de bicarbonato de sódio, foram igualmente testadas duas concentrações de HEPES, 10 μM e 25 μM . Como pode ser observado na Figura 06, ao aumentar a concentração de HEPES a

viabilidade celular diminui em aproximadamente 10 % ($p < 0,005$). Conclui-se, então, que para o cultivo de células Jurkat, a melhor composição dos sais é 2,0 g/L de bicarbonato de sódio e 10 μM de HEPES.

Viabilidade de células Jurkat após 72 horas de incubação

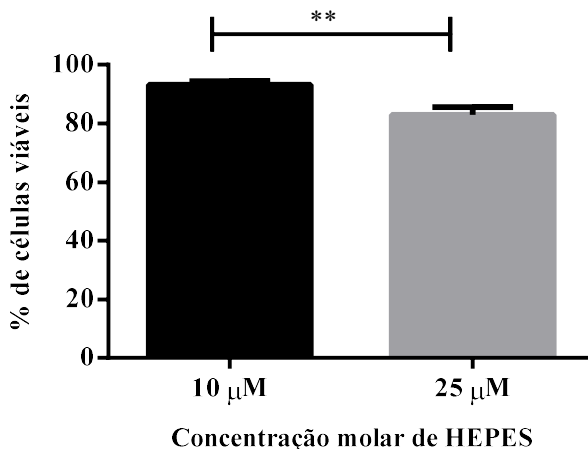


Figura S02. Viabilidade de células Jurkat após 72 de incubação. Avaliação da porcentagem de células viáveis após 72 horas de incubação com plaqueamento utilizando meio RPMI 1640 com 10 μM ou 25 μM de HEPES. A diferença significativa foi observada utilizando o teste t onde (**) $p=0,0036$.

11.1.3 Padronização do tamanho da placa

Uma vez determinada a composição do meio de cultura ideal, foi avaliada a influência do tamanho da placa na viabilidade e no crescimento celular. Utilizando as variáveis padronizadas nos experimentos anteriores, foram testadas placas da mesma marca que apresentavam área de crescimento celular distintas: 6 poços (9,6 cm^2), 12 poços (3,85 cm^2) e 24 poços (1,93 cm^2).

Observa-se na Figura 07 que somente após 48 horas de incubação começa a ser notada uma influência do tamanho da placa na viabilidade celular e esse perfil se mantém até 72 horas. Apenas a placa de 24 poços, que apresenta menor área de crescimento, tem influência na

diminuição significativa na viabilidade celular, sendo que, as placas de 6 e 12 poços, até 72 horas de incubação, não apresentaram diferenças na taxa de viabilidade celular.

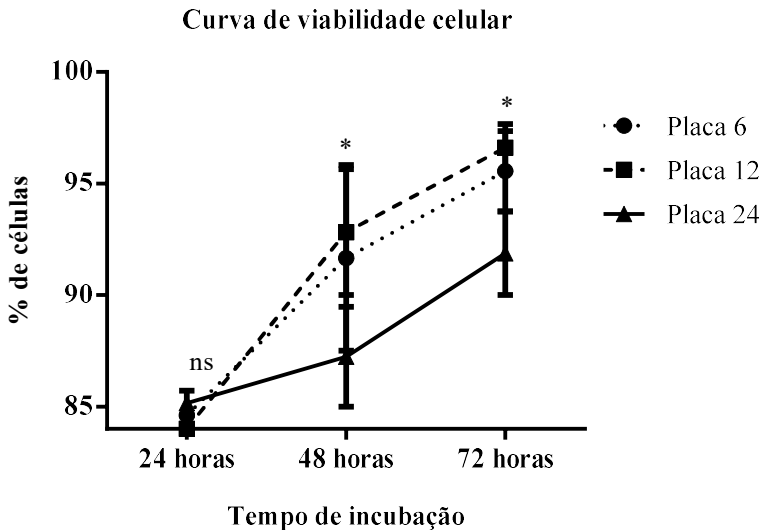


Figura S03. Curva de viabilidade de células Jurkat. Análise da viabilidade celular em função do tempo de incubação (24, 48 ou 72 horas) em placas com 6, 12 ou 24 poços. A diferença significativa foi observada através da análise múltipla onde (**) $p=0,0136$.

Além da viabilidade celular, neste mesmo experimento foi possível realizar uma curva de crescimento celular (Figura 08) e determinar a influência do tamanho da placa no número total de células após as 72 horas de incubação. Dessa forma, 2×10^5 células em 2 ml de meio de cultura foram semeadas nas placas de 6 poços ($9,6 \text{ cm}^2/\text{poço}$), 12 poços ($3,85 \text{ cm}^2/\text{poço}$) e 24 poços ($1,93 \text{ cm}^2/\text{poço}$), a cada 24 horas as células foram contadas em câmara de Neubauer.

Observou-se que nas primeiras 24 horas, as células começaram o processo de divisão celular; no entanto o tamanho da placa não influenciou no processo de expansão celular. Após 48 horas de incubação é possível observar que as células presentes na placa de 24 poços

diminuíram o ritmo de multiplicação celular e essa diferença ficou mais expressiva após 72 horas de incubação.

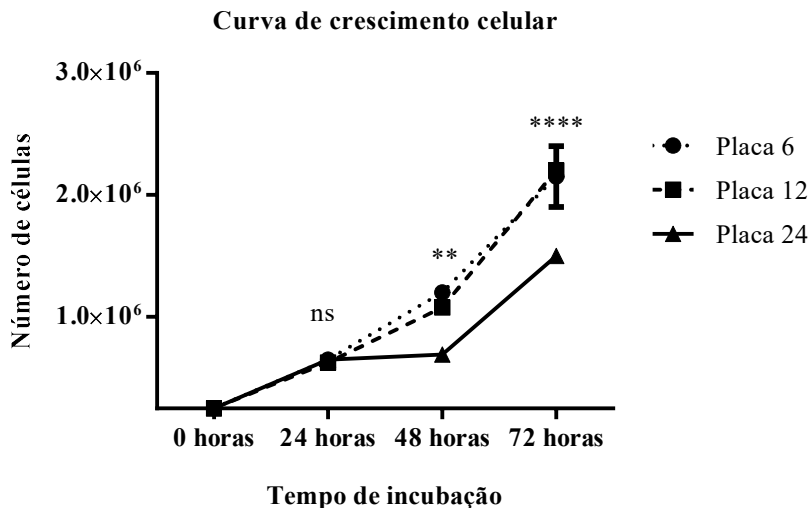


Figura S04. Curva de crescimento de células Jurkat. Análise do crescimento celular em função do tempo (24, 48 ou 72 horas) em três diferentes tamanhos de placas com 6, 12 ou 24 poços. A diferença significativa foi observada através da comparação múltipla onde (****) $p < 0,00001$, (**) $p < 0,001$ e ns não significativo.

Com os resultados obtidos, concluiu-se que a área de crescimento das placas de cultura exerce uma influência expressiva tanto na viabilidade quanto na taxa de crescimento celular após 72 horas de incubação. Dessa forma, foi possível observar que placas com menor área, como a de 24 poços, podem diminuir de forma significativa a densidade e a viabilidade celular. As placas de 6 e 12 poços, quando semeadas com uma concentração inicial de 2×10^5 células e incubadas durante 72 horas são capazes de manter a taxa de multiplicação constante e uma alta taxa de viabilidade celular. Dessa forma escolheu-se a placa de 12 poços para dar continuidade aos experimentos.

11.1.4 Padronização da concentração de SBF

O SBF é composto por diversas proteínas e fatores de crescimento que auxiliam na multiplicação celular e por isso determinar a concentração ideal é importante para controlar o número e a viabilidade celular. Sendo assim, foram testadas a ausência (0%) e as concentrações de 3% e 10% de SBF nas condições de cultura celular. Foi observado que utilizar o meio de cultura na ausência de SBF ou na concentração de 10% ocorreu redução da viabilidade celular. Quando o meio de cultura foi suplementado com 3% de SBF a viabilidade celular manteve-se em 94,23%. Dessa forma, determinou-se que a concentração ideal para o cultivo seria de 3%.

Em conjunto esses resultados concluem o primeiro objetivo deste trabalho: a padronização das condições ideais de cultivo de células Jurkat para experimentos com estímulo em até 72 horas; dessa forma determinou-se o plaqueamento inicial de 2×10^5 células em placas de 12 poços, contendo 2 ml de meio RPMI 1640 contendo 2,0 g/L de bicarbonato de sódio e 10 μ M de HEPES, suplementado com 3% de SBF e 2 mM de L-glutamina.

11.1.5 Validação das condições padronizadas

Com o objetivo de validar a padronização das condições ideais de cultivo e confirmar que o plaqueamento não estava induzindo morte celular, foi realizado uma análise preliminar comparativa do perfil das células quando cultivadas em placa de 12 poços e na garrafa de manutenção da cultura. Para este experimento, 10^5 células/ml foram semeadas nas condições padronizadas anteriormente, tanto na placa de 12 poços quanto na garrafa de cultura de 25 cm², em seguida foram incubadas na estufa de CO₂ durante 72 horas.

Após o período de incubação, as células foram coletadas e 50.000 eventos foram adquiridos no citometro de fluxo. Os eventos adquiridos foram analisados com base nas informações sobre tamanho (*Foward Scatter* - FSC) e complexidade (*Side Scatter* - SSC) das células, sendo possível identificar a presença de duas populações que se agrupavam de forma distintas (Figura 09). As duas populações celulares foram separadas por dois *gates* (A e B), sendo o *gate* A conhecido como “canal de morte”. No canal de morte, estão compreendidos os eventos que apresentam características de células mortas, com o tamanho

reduzido e diferentes níveis de complexidade; os eventos do *gate* B representam uma população celular mais homogênea com as características de células T viáveis, com maior tamanho e menor complexidade.

A partir dessa análise preliminar, foi possível observar que não há diferença significativa no perfil de desenvolvimento celular quando as células são incubadas por até 72 horas em placas de 12 poços ou em garrafas de 25 cm², sendo que, o plaqueamento não leva a morte celular.

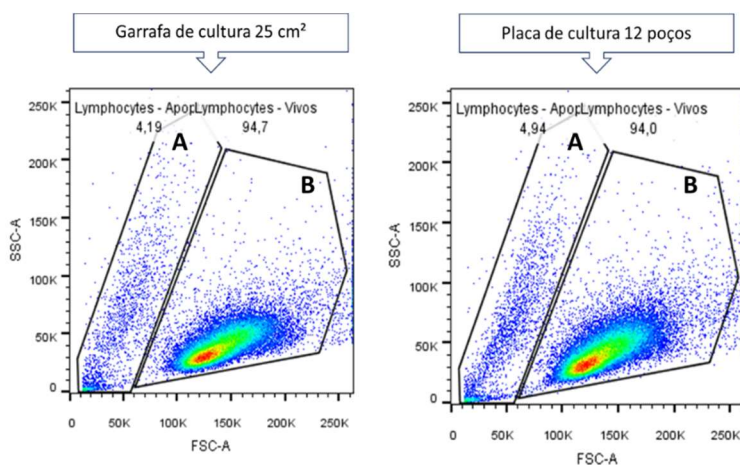


Figura S05. Avaliação da distribuição e frequência das células Jurkat nos *gates*. Gráfico *dotplot* demonstrando a distribuição em função do tamanho (FSC-A) e a complexidade intracelular (SSC-A) em garrafa de cultura e placa de 12 poços e a frequência de eventos nos *gates* (A) representando o canal de morte e em (B) representando células viáveis.

11.1.6 Determinação da taxa basal de apoptose

As análises preliminares já indicavam que o cultivo em placas de 12 poços não estava modificando o perfil de desenvolvimento da cultura celular. Com o objetivo de confirmar esse resultado e determinar os reais níveis basais de apoptose no cultivo celular, foi realizada a marcação das células com Anexina V e Iodeto de propídeo. Seguindo o mesmo protocolo do experimento anterior, as células foram contadas e incubadas em meio de cultura durante 72 horas. Após o período de

incubação, as células foram processadas e marcadas com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo, seguindo o protocolo que foi otimizado e padronizado para as células Jurkat.

Em seguida, 50.000 eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo e posteriormente analisados no programa FlowJo®. Foram selecionados os eventos que compunham a população de células T viáveis. Os eventos selecionados foram separados em *gates*, como demonstrados na figura 04, onde cada quadrante separa populações celulares com diferentes intensidades de fluorescência e indicam diferentes fenótipos celulares. O quadrante Q4 compreende os eventos que apresentam baixo nível de fluorescência e indicam células viáveis em ambos os frascos de cultura; os quadrantes Q3 e Q2 indicam células em estágio inicial e tardio de apoptose, respectivamente; o quadrante Q1 indica células mortas pelo processo de necrose.

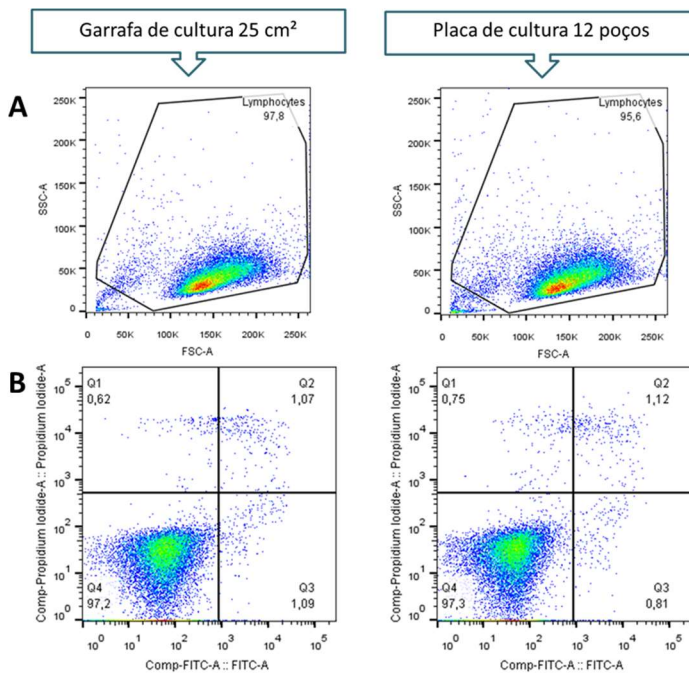


Figura S06. Determinação da frequência de células Jurkat em processo de apoptose através da marcação celular com Anexina-V e PI. (A)

representa a seleção do *gate* e a distribuição dos eventos em função do tamanho (FSC-A) e a complexidade intracelular (SSC-A) em garrafa de cultura e placa de 12 poços; em (B) apresentado pelo dotplot demonstrando a frequências das células viáveis (Q4), células em processo inicial de apoptose (Q3), células em processo tardio de apoptose (Q2) e células em processo de necrose (Q1).

A soma dos quadrantes Q1, Q2 e Q3 indicam a proporção de células mortas na cultura enquanto o Q4 indica a proporção total de células viáveis. Observou-se que o cultivo das células durante 72 horas na placa de 12 poços apresentou uma taxa de apoptose basal tão baixa quanto o cultivo na garrafa (Figura 05), sendo que, a perda de viabilidade celular foi observada em apenas 2,6% do total de células. Foi observado que os índices de viabilidade celular são semelhantes quando comparada as condições experimentais em placas de 12 polos e o cultivo de manutenção em garrafas.

Viabilidade de células Jurkat após 72 horas de incubação

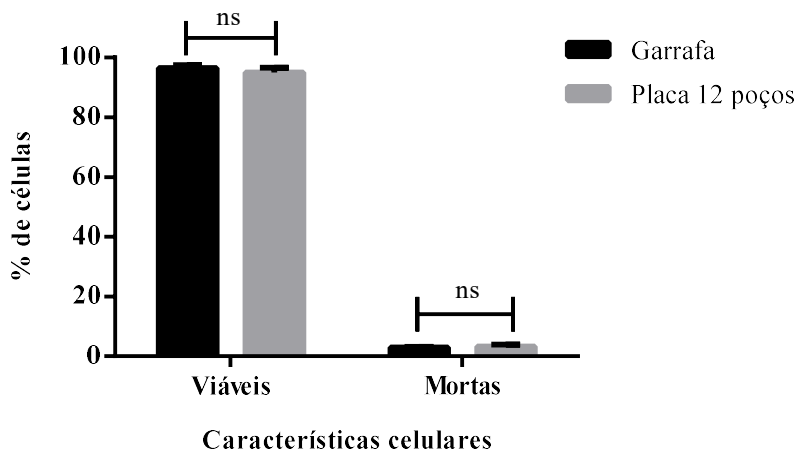


Figura S07. Viabilidade de células Jurkat após 72 horas de incubação. Análise da porcentagem de células viáveis e células em mortas, obtidas a partir da marcação celular com anexina-V e Pi. A diferença significativa foi observada através a comparação múltipla onde ns considera-se não significativo.

Em conjunto, esses dados indicam que as condições de cultivo padronizados no item 6.2.4 mantêm a viabilidade celular nos mesmos níveis que o cultivo em garrafas de cultura. Ou seja, cultivar células em placas de 12 poços não altera o crescimento nem a viabilidade celular, bem como apresenta um nível de apoptose basal semelhante do cultivo de manutenção em garrafa, pois toda cultura celular apresentam uma taxa de apoptose basal inerente à técnica.

11.2 Determinação da concentração molar de proteína Tat

A proteína Tat recombinante adquirida da empresa Diatheva (Fano, Itália) apresenta peso molar de aproximadamente 20,1 kDa e foi reconstituída em 1 ml da solução indicada pelo fabricante (PBS 0,01% de glicerol e inibidor de protease), obtendo-se uma concentração final de 100 ng/ μ l. Com auxílio da ferramenta *Biomath Molar Conversion* disponível no site da Promega (<http://www.promega.com/a/apps/biomath/>) e utilizando a fórmula: $pmol\ protein = \mu g\ protein / protein\ size\ (kDa) \times kg / 10^9\ \mu g \times 10^{12}\ pmol / mole$, foi possível calcular o número de moléculas de proteína presentes na solução. Com base no seu peso molecular de aproximadamente 20 kDa em 100 μ g de massa liofilizada, obteve-se ao final 5.000 pmol de proteína Tat recombinante.

No entanto, para facilitar posteriormente a comparação dos resultados com os artigos que serviram de base para a definição do desenho experimental, foi necessário determinar a concentração molar da proteína nesse volume final de 1 ml. Para calcular a concentração molar de compostos química se utilizou-se a seguinte fórmula matemática:

$$M = \frac{m_1}{M_1 \cdot V}$$

onde M é a molaridade, m_1 é a massa do soluto em gramas, M_1 é a massa molar do soluto e V é o volume do solvente em litros. Quando se trabalha com compostos químicos, a massa molar é facilmente calculada de acordo com a composição química; no entanto, as proteínas

apresentam estruturas mais complexas e o valor da massa molar das proteínas é dado em kDa (Quilodaltons). Cada kDa equivale a 1 kg/mol de massa molar de uma proteína; dessa forma, uma proteína que apresenta peso de 20,1 kDa tem 20 kg/mol de massa molar. Com base nessa afirmação, foi possível determinar a concentração molar da proteína Tat em 1 ml de solução 5×10^{-6} mol/L ou 5 μ M.